

10/551929

DOCKET NO.: 279089US0PCT

JC20 Rec'd PCT/PTO 05 OCT 2005

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Frederic TARAN, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR04/50158

INTERNATIONAL FILING DATE: April 13, 2004

FOR: METHOD FOR SCREENING PROCESS CONDITIONS OF A CHEMICAL COUPLING REACTION AND KITS THEREFOR

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
France	03 50106	15 April 2003

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR04/50158.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Surinder Sachar

Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION



COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 19 MARS 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété Industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cédex 08
Téléphone: 01.53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livreVI
REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES:	15.04.2003
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL:	0350106
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT:	75
DATE DE DÉPÔT:	15.04.2003

Jean LEHU
BREVATOME
3, rue du Docteur Lanceraux
75008 PARIS
France

Vos références pour ce dossier: B14076.3/SL BD1417

1 NATURE DE LA DEMANDE			
Demande de brevet			
2 TITRE DE L'INVENTION			
PROCEDE DE CRIBLAGE DE CONDITIONS OPERATOIRES D'UNE REACTION CHIMIQUE DE COUPLAGE ET TROUSSES POUR LA MISE EN ŒUVRE DE CE PROCEDE			
3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE		Pays ou organisation	Date
4-1 DEMANDEUR		N°	
Nom	COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE		
Rue	31-33, rue de la Fédération		
Code postal et ville	75752 PARIS 15ème		
Pays	France		
Nationalité	France		
Forme juridique	Etablissement Public de Caractère Scientifique, technique et Ind		
5A MANDATAIRE			
Nom	LEHU		
Prénom	Jean		
Qualité	Liste spéciale: 422-5 S/002, Pouvoir général: 7068		
Cabinet ou Société	BREVATOME		
Rue	3, rue du Docteur Lanceraux		
Code postal et ville	75008 PARIS		
N° de téléphone	01 53 83 94 00		
N° de télécopie	01 45 63 83 33		
Courrier électronique	brevets.patents@brevalex.com		
6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS			
Texte du brevet	Fichier électronique	Pages	Détails
Dessins	textebrevet.pdf	64	D 49, R 14, AB 1
Pouvoir général	dessins.pdf	3	page 3, figures 4

7 MODE DE PAIEMENT				
Mode de paiement	Prélèvement du compte courant			
Numéro du compte client	024			
8 RAPPORT DE RECHERCHE				
Etablissement immédiat				
9 REDEVANCES JOINTES		Devise	Taux	Quantité
062 Dépôt		EURO	0.00	1.00
063 Rapport de recherche (R.R.)		EURO	320.00	1.00
068 Revendication à partir de la 11ème		EURO	15.00	16.00
Total à acquitter		EURO		560.00

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Signé par

Signataire: FR, Brevatome, J.Lehu

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

Réception électronique de la soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou de certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été attribués automatiquement.

Demande de brevet: X

Demande de CU:

DATE DE RECEPTION	15 avril 2003	
TYPE DE DEPOT	INPI (PARIS) - Dépôt électronique	Dépôt en ligne: X
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI	0350106	Dépôt sur support CD:
Vos références pour ce dossier	B14076.3/SL BD1417	

DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale	COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
Nombre de demandeur	1
Pays	FR

TITRE DE L'INVENTION

PROCEDE DE CRIBLAGE DE CONDITIONS OPERATOIRES D'UNE REACTION CHIMIQUE DE COUPLAGE ET TROUSSES POUR LA MISE EN ŒUVRE DE CE PROCEDE

DOCUMENTS ENVOYES

pkgheader.xml	Requetefr.PDF	fee-sheet.xml
package-data.xml	ValidLog.PDF	textebrevet.pdf
FR-office-specific-info.xml	application-body.xml	request.xml
dessins.pdf	indication-bio-deposit.xml	

EFFECTUE PAR

Effectué par:	J.Lehu
Date et heure de réception électronique:	15 avril 2003 11:40:17
Empreinte officielle du dépôt	F7:E8:55:46:81:DE:7F:FC:18:2E:1E:24:9C:3F:BA:35:31:91:7F:0D

/ PARIS, Section Dépôt /

SIEGE SOCIAL
 INSTITUT 26 bis, rue de Saint Petersbourg
 NATIONAL DE 75800 PARIS cedex 08
 LA PROPRIETE Téléphone : 01 53 04 53 04
 INDUSTRIELLE Télécopie : 01 42 83 59 30

PROCEDE DE CRIBLAGE DE CONDITIONS OPERATOIRES D'UNE
REACTION CHIMIQUE DE COUPLAGE ET TROUSSES POUR LA MISE
EN OEUVRE DE CE PROCEDE

5

DESCRIPTION

DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention se rapporte à un procédé de criblage de conditions opératoires d'une réaction chimique de couplage, ainsi qu'à des trousses propres à permettre la mise en œuvre de ce procédé.

De façon plus précise, elle se rapporte à un procédé permettant de tester simultanément les effets de différentes conditions opératoires sur le rendement d'une réaction consistant à coupler au moins deux groupements fonctionnels en vue, par exemple, de sélectionner celle ou celles de ces conditions qui conduisent à une optimisation de ce rendement.

Ces conditions opératoires peuvent être aussi bien qualitatives que quantitatives.

Ainsi, le procédé peut servir à cibler des substances, comme des catalyseurs ou des solvants, dont on souhaite savoir si elles sont susceptibles de présenter une utilité dans une réaction de couplage particulière, mais il peut également être employé pour cibler des niveaux, par exemple de température ou de pression, des concentrations, des rapports stœchiométriques ou des durées comme la durée de réaction ou la durée d'agitation du milieu réactionnel, dont on souhaite connaître l'influence sur le rendement d'une réaction de couplage.

Le procédé selon l'invention est donc susceptible de trouver de très nombreuses applications dans le domaine de la recherche, tant fondamentale qu'appliquée.

5 Ainsi, par exemple, il peut être utilisé dans des études fondamentales visant à une meilleure compréhension des mécanismes de la catalyse homogène ou hétérogène et ce, qu'elle soit chimique ou biologique.

10 Il peut également être utilisé dans des études de recherche appliquée, en particulier dans les secteurs de la chimie, de l'agroalimentaire, de la pharmacie et de la protection de l'environnement, ayant pour objectif, soit de développer des catalyseurs plus performants ou plus aptes à répondre spécifiquement à 15 des contraintes particulières, soit d'optimiser les rendements de réactions de synthèse ou les conditions expérimentales, en vue par exemple d'abaisser les coûts de mise en œuvre de ces réactions.

20 Notamment, il peut servir à cibler une banque d'enzymes mutées afin d'améliorer les performances catalytiques d'une enzyme "sauvage", ou à cibler des milieux biologiques de composition connue ou inconnue dans le but d'identifier l'existence d'une activité catalytique particulière dans ces milieux.

25

ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

En matière de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage, ce sont essentiellement des procédés destinés à cibler des 30 catalyseurs qui ont été proposés jusqu'à présent.

Ces procédés comprennent tous une étape consistant à faire réagir deux composés particuliers, représentatifs des familles de composés pour lesquelles la réaction de couplage est susceptible d'être 5 utilisée, en présence des différents catalyseurs candidats, suivie d'une étape consistant à apprécier l'efficacité de ces catalyseurs sur ladite réaction.

Ainsi, on connaît, en premier lieu, des procédés qui visent à analyser, à l'issue de la 10 réaction de couplage, la composition des milieux réactionnels par chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC), ce qui implique qu'il faut d'abord les purifier, par exemple par filtration sur des colonnes de gel de silice.

15 Il s'agit donc de procédés lourds à mettre en œuvre, qui ne permettent d'effectuer qu'un nombre limité de tests par jour et qui sont, par conséquent, totalement inadaptés à un criblage à moyen ou haut débit.

20 Il existe, en second lieu, des procédés qui visent à employer, à l'issue de la réaction de couplage, un réactif chimique qui est capable de réagir, soit avec l'un des composés engagés dans cette réaction de couplage, soit avec le produit ou un sous- 25 produit issu de ladite réaction, en générant un signal comme une coloration, une décoloration, l'émission d'une fluorescence ou d'une chimio-luminescence.

A titre d'exemples, on peut citer :

30 - le procédé décrit par Lavastre et Morken dans *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38(21), 3163-3165, [1], pour le criblage de catalyseurs utiles dans une

alkylation allylique et qui prévoit de détecter le 1-naphtol produit au cours de cette alkylation en le faisant réagir avec le sel de diazonium connu sous le nom de "Fast Red Violet LB", pour le faire virer à 5 l'orange vif ;

- celui décrit par Böhm et Herrmann dans *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, 3679-3681, [2], pour le criblage de catalyseurs utiles dans la réaction de Sonogashira et qui consiste à révéler le produit de 10 cette réaction en l'oxydant par du KMnO_4 , ce qui provoque une décoloration des milieux réactionnels ; et

- celui proposé par Löber et al. dans *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 4366-4367, [3], pour le criblage de catalyseurs utiles dans l'hydroamination de 15 1,3-diènes par des arylamines comme l'aniline, et qui consiste à révéler l'aniline résiduelle en la faisant réagir avec du furfural en présence d'un acide, ce qui a pour effet de colorer en rouge les milieux réactionnels.

20 Ce second type de procédés présente, lui, l'inconvénient de nécessiter des réactifs spécifiques de l'un des composés engagés dans la réaction de couplage ou du produit formé par cette réaction, ce qui limite son utilisation au criblage de réactions mettant 25 en jeu des composés ou aboutissant à des produits pour lesquels de tels réactifs sont disponibles.

Il existe, encore, des procédés dans lesquels l'un des composés engagés dans la réaction de couplage est fixé sur un support solide, tandis que 30 l'autre est marqué par une sonde fluorescente. Les deux composés étant mis à réagir, l'efficacité de la

catalyse se traduit par la formation sur le support solide du produit issu de la réaction. Il convient alors de laver ce support pour éliminer la fraction des composés n'ayant pas réagi et de détecter le produit 5 issu de la réaction par lecture de la fluorescence présente sur ledit support.

Un exemple de ces procédés est illustré dans l'article de Shaugnessy et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 2123-2132, [4]) pour le criblage de 10 catalyseurs utiles dans la réaction de Heck. Dans cet exemple, le premier composé est un halogénure d'aryle qui est fixé sur une résine de polystyrène réticulé (résine de Wang), tandis que le second composé est un acrylate marqué par de la coumarine.

15 Ce dernier type de procédés présente deux inconvénients majeurs. Tout d'abord, la catalyse est réalisée en milieu hétérogène. Or, on sait qu'un catalyseur qui manifeste une haute activité catalytique en milieu hétérogène peut parfaitement se révéler 20 inefficace en milieu homogène. Par ailleurs, l'appréciation de la catalyse est essentiellement qualitative, dans la mesure où il est difficile de calculer le rendement de la réaction de couplage puisque ce calcul nécessiterait de connaître le taux de 25 greffage du premier composé sur le support solide.

Un autre type encore de procédés est basé sur le fait qu'en présence d'un catalyseur efficace, le dégagement de chaleur d'une réaction s'effectue plus rapidement qu'en présence d'un catalyseur inefficace. 30 Ainsi, il est possible d'apprécier l'efficacité de catalyseurs en mesurant la variation de température des

milieux réactionnels, soit par calorimétrie, soit par thermographie au moyen de caméras à infrarouges ultrasensibles fixées au-dessus desdits milieux réactionnels.

5 Un exemple de mise en œuvre de ce type de procédés est illustré dans la publication de Blackmond et al. (*Organic Process Research & Development*, 1999, 3(4), 275-280, [5]) pour le criblage de catalyseurs utiles dans la réaction de Heck.

10 Les procédés de criblage par analyse thermique ont le défaut de nécessiter un matériel lourd et onéreux. Par ailleurs, ils ne permettent pas un calcul du rendement réactionnel. Enfin, ils ne sont pas applicables à des réactions qui se déroulent lentement 15 et qui, de ce fait, dégagent des quantités de chaleur qui ne sont pas détectables ou suffisamment significatives.

Enfin, il a été proposé par Hinderling et Chen dans *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38(15), 2253-20 2256, [6], d'utiliser la spectrophotométrie de masse couplée à l'électropulvérisation pour effectuer le criblage de catalyseurs de polymérisation d'oléfines. Là également, il s'agit d'un procédé qui requiert un appareillage lourd et coûteux.

25 Il existe donc un réel besoin de disposer d'un procédé qui permette de tester les effets de différentes conditions opératoires sur une réaction de couplage et, plus particulièrement, l'utilité potentielle de catalyseurs dans cette réaction, et qui, 30 d'une manière générale, soit exempt de tous les

inconvénients présentés par les procédés de criblage proposés jusqu'à présent.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

5 La présente invention répond précisément à ce besoin en fournissant un procédé de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage d'au moins deux groupements fonctionnels, qui comprend les étapes suivantes :

10 i) faire réagir ensemble au moins deux composés :

• un premier composé de formule $E_1-X_1-G_1$ dans laquelle G_1 représente un premier desdits au moins deux groupements fonctionnels, X_1 représente une liaison covalente ou un premier groupe espaceur, tandis que E_1 représente le reste d'une première molécule M_1 pour laquelle on dispose d'un premier anticorps AC_1 spécifique, et

20 • un deuxième composé de formule $E_2-X_2-G_2$ dans laquelle G_2 représente un deuxième desdits au moins deux groupements fonctionnels, X_2 représente une liaison covalente ou un deuxième groupe espaceur, identique ou différent de X_1 , tandis que E_2 représente, soit le reste d'une deuxième molécule M_2 différente de M_1 et pour laquelle on dispose d'un deuxième anticorps AC_2 spécifique, soit un groupe apte à former au moins une liaison covalente avec l'anticorps AC_1 en présence d'un agent de couplage ;

25 lesdits au moins deux composés étant mis à réagir en solution dans un solvant et dans des conditions opératoires prédéterminées dont l'une au moins est une

condition opératoire candidate, pour obtenir un milieu réactionnel et la formation dans ce milieu d'un composé Z comprenant l'enchaînement $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$ dans lequel X_1 , X_2 , E_1 et E_2 ont la même signification que 5 précédemment, tandis que G_1-G_2 représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits au moins deux groupements fonctionnels ;

10 ii) déterminer la concentration en composé Z du milieu réactionnel à un temps t de réaction prédéterminé, par au moins un dosage immunologique utilisant au moins l'anticorps AC_1 ; et

15 iii) évaluer les effets de la ou des conditions opératoires candidates sur ladite réaction de couplage à l'aide de la concentration en composé Z ainsi déterminée.

Ainsi, dans le procédé selon l'invention, la réaction de couplage, dont on veut cribler les conditions opératoires et qui met en jeu au minimum deux groupements fonctionnels, en l'espèce G_1 et G_2 , est 20 réalisée en utilisant comme réactifs, au moins deux composés qui comportent chacun, à une extrémité, l'un de ces groupements fonctionnels et, à l'autre extrémité, le reste d'une molécule, respectivement M_1 et M_2 , pour laquelle on dispose d'un anticorps 25 spécifique, respectivement AC_1 et AC_2 , ou, dans le cas du deuxième composé, un groupe apte à former une ou plusieurs liaisons covalentes avec l'anticorps AC_1 spécifique de la molécule M_1 en présence d'un agent de couplage.

30 La concentration du milieu réactionnel en composé Z produit par la réaction de couplage peut

ainsi être aisément déterminée, à un temps t de réaction choisi, par au moins un dosage immunologique, ce dosage utilisant, soit uniquement l'anticorps AC₁, soit les deux anticorps AC₁ et AC₂.

5 Une fois la concentration en composé Z connue, il est alors possible de déterminer par un calcul le rendement de la réaction de couplage et d'apprécier les effets des conditions opératoires dans lesquelles elle a été réalisée par la valeur de ce
10 rendement. Ces effets peuvent, toutefois, être également appréciés en comparant ladite concentration à une ou plusieurs concentrations préalablement obtenues dans des conditions opératoires différentes et servant de valeurs de référence.

15 Dans ce qui précède et ce qui suit, on entend :

 - par "condition opératoire candidate", une condition opératoire dont on teste les effets sur la réaction de couplage ;

20 - par "reste" d'une molécule M₁, la partie de cette molécule qui subsiste dans le composé de formule E₁-X₁-G₁ lorsque ladite molécule est liée de façon covalente, soit au groupement fonctionnel G₁, soit au groupe espaceur, selon que X₁ représente une
25 liaison covalente ou un groupe espaceur ; de manière similaire, le "reste" d'une molécule respectivement M₂, M₃ ou M₄ correspond à la partie de cette molécule qui subsiste dans le composé respectivement de formule E₂-X₂-G₂, E₃-X₃-G₃ ou E₄-X₄-G₄ lorsque ladite molécule est
30 liée de façon covalente, soit au groupement fonctionnel respectivement G₂, G₃ ou G₄, soit au groupe espaceur

selon que X_2 , X_3 ou X_4 représente une liaison covalente ou un groupe espaceur.

Par ailleurs, on entend par "anticorps spécifique" d'une molécule, un anticorps apte à 5 reconnaître spécifiquement cette molécule et à se lier avec elle par une réaction immunologique antigène-anticorps.

10 Comme précédemment indiqué, dans les composés $E_1-X_1-G_1$ et $E_2-X_2-G_2$, G_1 et G_2 correspondent aux deux groupements fonctionnels qui sont au minimum engagés dans la réaction de couplage dont on veut cribler les conditions opératoires et sont donc choisis en fonction de cette réaction.

15 Des réactions de couplage impliquant deux groupements fonctionnels et pour lesquelles le procédé selon l'invention est susceptible d'être utilisé sont notamment les réactions de couplage intermoléculaires suivantes :

20 - les réactions d'estérification telles que celles qui consistent à coupler un acide carboxylique ($R-COOH$) ou un dérivé d'acide carboxylique comme, par exemple, un halogénure d'acide ($R-CO-Hal$), et un alcool ($R'-OH$) pour obtenir un groupe ester ($R-CO_2R'$) ;

25 - les réactions d'amidification telles que celles qui consistent à coupler un acide carboxylique ($R-COOH$) ou un dérivé d'acide carboxylique et une amine primaire ($R'-NH_2$) ou secondaire ($R'-NH-R''$) pour obtenir un amide ($R-CONH-R'$ ou $R-CONR'-R''$) ;

30 - les réactions d'aldolisation telles que celles qui consistent à coupler deux aldéhydes ($R-CHO$) ou deux cétones ($R-CO-R'$), ou à coupler un aldéhyde et

une cétone pour obtenir un aldol ou un cétol, et leurs variantes comme la réaction de nitro-aldolisation dans laquelle un aldéhyde est couplé à un composé nitré ($R'-CH_2-NO_2$) pour obtenir un nitro-alcool ($R-CH(OH)-CH(NO_2)-R'$) ;

5 - la réaction de Heck qui consiste à coupler une oléfine ($R'-CH=CH_2$) et un halogénure organique ($R'-Hal$) pour obtenir un alcène ($R-CH=CH-R'$), et ses variantes ;

10 - la réaction de Baylis-Hillman qui consiste à coupler un alcène ($R-CH=CH_2$) et un aldéhyde ($R'-CHO$) pour obtenir un alcool allylique ($R'-C(CH_2)-CH(OH)-R'$), et ses variantes ;

15 - la réaction de Michael qui consiste en une addition entre un composé nucléophile et un composé insaturé accepteur d'électrons (par exemple, $R-CH=CH_2$), et ses variantes ;

20 - les réactions de métathèse comme celles qui consistent à coupler deux oléfines (par exemple, $R-CH=CH_2$ et $R'-CH=CH_2$) pour en obtenir une troisième ($R-CH=CH-R'$) ;

- la réaction de Diels-Alder qui consiste en une cycloaddition entre un diène et un diénophile ;

25 - la réaction de Sonogashira qui consiste à coupler un alcyne ($R-C\equiv CH$) et un halogénure d'aryle ($Ar-Hal$) pour obtenir un arylalcyne ($R-C\equiv C-Ar$), et ses variantes ;

- la réaction de Suzuki qui consiste à coupler un acide arylboronique ($Ar-B(OH)_2$) et un

halogénure d'aryle ($Ar'-Hal$) pour obtenir un diaryle ($Ar-Ar'$), et ses variantes ;

5 - la réaction de Kumada qui consiste à coupler un réactif de Grignard ($R-Mg-Hal$) et un halogénure d'alkyle, de vinyle ou d'aryle, et ses variantes ;

10 - la réaction de Stille qui consiste à coupler un composé organostannique (par exemple, $Ar-SnBu_3$) et un halogénure organique (par exemple, $Ar'-Br$), et ses variantes ;

- la réaction de Hiyama qui consiste à coupler un organosilane (par exemple, $Ar-SiR_3$) et un halogénure organique (par exemple, $Ar'-Br$), et ses variantes ; et

15 - la réaction de Liebeskind-Srogl qui consiste à coupler un acide boronique (par exemple, $Ar-B(OH)_2$) et un thioester ($R-CO-S-R'$) pour obtenir une cétone, et ses variantes.

20 Des réactions de couplage impliquant trois groupements fonctionnels sont notamment la réaction de Mannich qui consiste à coupler un composé ayant un hydrogène actif avec un aldéhyde non énolisable et une amine primaire ou secondaire pour obtenir un composé aminométhylé, la réaction de Hantzsch qui consiste à 25 coupler une amine avec un aldéhyde et une α -bromo cétone pour obtenir un pyrrôle, et la réaction de Bossio et al. qui consiste à coupler un α -cétoaldéhyde avec un acide carboxylique et un iso-nitrile pour obtenir une oxazole, tandis qu'une réaction de couplage 30 impliquant quatre groupements fonctionnels est, par

exemple, la réaction de Ugi qui consiste à coupler un acide carboxylique, une amine primaire, un composé carbonylé et un isocyanure pour obtenir un composé α -aminocarboxamide.

5 Par ailleurs, dans les composés de formules $E_1-X_1-G_1$ et $E_2-X_2-G_2$, E_1 représente le reste d'une molécule M_1 pour laquelle on dispose d'un premier anticorps spécifique AC_1 , tandis que E_2 peut représenter le reste d'une molécule M_2 pour laquelle on dispose 10 d'un deuxième anticorps spécifique AC_2 .

Ces deux restes doivent présenter des propriétés antigéniques analogues à celles des molécules M_1 et M_2 dont ils sont issus, de manière à être reconnus respectivement par l'anticorps AC_1 et par 15 l'anticorps AC_2 , et à former avec eux une liaison immunologique, mais ils ne doivent ni gêner le déroulement de la réaction de couplage, notamment par un encombrement stérique, ni interférer dans cette réaction.

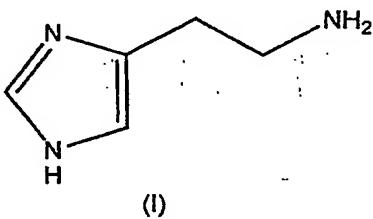
20 Aussi, les molécules M_1 et M_2 sont-elles, de préférence, des haptènes, c'est-à-dire des petites molécules qui, après greffage sur un vecteur tel qu'une protéine (sérum albumine bovine, γ -immunoglobuline, ...) ou un polysaccharide, sont aptes à induire chez 25 l'animal la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre elles.

Ces haptènes peuvent notamment être des hydrocarbures comme le naphthalène, l'anthracène, le phénanthrène, le bicyclo[2.2.2]octane, le bicyclo-30 [2.2.2]heptane, le 2,2-diméthyl-3-méthyl-4,4-diméthylpentane, l'adamantane, le perhydrophénalène et le

perhydroanthracène, substitués par une fonction réactive, de préférence acide carboxylique, amine ou thiol, propre à permettre, d'une part, de les greffer sur le vecteur et, d'autre part, de les lier aux groupements fonctionnels G_1 et G_2 ou aux groupes espaceurs dans le cas où X_1 et X_2 représentent de tels groupes. De tels hydrocarbures présentent, en effet, l'avantage d'être relativement inertes sur le plan chimique.

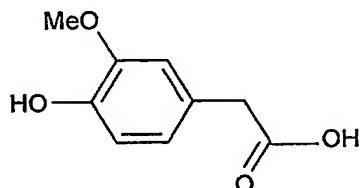
Toutefois, ces haptènes peuvent également être des molécules autres que des hydrocarbures auquel cas si, dans les composés $E_1-X_1-G_1$ et $E_2-X_2-G_2$, les restes de ces molécules comportent un ou plusieurs groupes fonctionnels libres susceptibles de réagir aux conditions opératoires dans lesquelles est réalisée la réaction de couplage, il convient que ce ou ces groupes fonctionnels soient protégés par un groupe protecteur convenablement choisi avant de procéder à la réaction de couplage, c'est-à-dire préalablement à l'étape i) du procédé, puis déprotégés entre les étapes i) et ii).

Deux molécules se sont révélées constituer des haptènes particulièrement intéressants pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention. Il s'agit, d'une part, de l'histamine qui répond à la formule (I) ci-après :



et pour laquelle il a été possible d'obtenir plusieurs anticorps monoclonaux présentant un K_d au moins égal à 10^{-8} M, et, d'autre part, de l'acide homovanillique qui répond à la formule (II) ci-après :

5

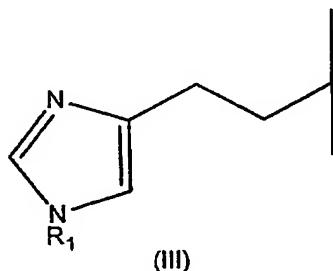


(II)

et pour lequel il a été possible d'obtenir plusieurs anticorps monoclonaux présentant un K_d au moins égal à 10^{-6} M.

10 Aussi, selon une première disposition préférée du procédé selon l'invention, E_1 dans le composé $E_1-X_1-G_1$ ou E_2 dans le composé $E_2-X_2-G_2$ répond-il à la formule (III) ci-après :

15

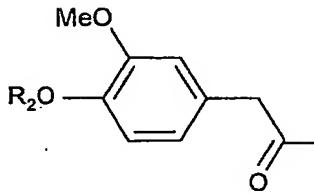


(III)

20 dans laquelle R_1 représente un atome d'hydrogène ou un groupe protecteur d'une fonction amine comme, par exemple, un groupe tert-butyloxycarboxyle (BOC) ou un groupe benzyle.

Selon une autre disposition préférée du procédé selon l'invention, E_1 dans le composé $E_1-X_1-G_1$

ou E_2 dans le composé $E_2-X_2-G_2$ répond à la formule (IV) ci-après :



(IV)

5 dans laquelle R_2 représente un atome d'hydrogène ou un groupe protecteur d'une fonction alcool comme, par exemple, un groupe silylé du type diméthyl *tert*-butylsilyle, le dihydropyrane ou encore un groupe benzyle, allyle ou acétal.

10 Dans le composé $E_2-X_2-G_2$, E_2 peut ne pas représenter le reste d'une molécule M_2 , mais un groupe apte à former au moins une liaison covalente avec l'anticorps AC_1 en présence d'un agent de couplage, auquel cas ce groupe est avantageusement choisi parmi 15 les groupes amine, acide carboxylique, aldéhyde, thiol, phénol, alkényle, azoture et les groupes photo-activables comme, par exemple, les groupes benzophénone et arylazide.

20 De préférence, E_2 est un groupe amine ou thiol.

Comme précédemment indiqué, dans les composés $E_1-X_1-G_1$ et $E_2-X_2-G_2$, E_1 et E_2 peuvent être liés aux groupements fonctionnels G_1 et G_2 , soit directement, soit par l'intermédiaire de groupes espaces.

25 Ces groupes espaces, qui n'ont, pour seule fonction, que celle de former un pont entre, d'une part, E_1 et le groupement fonctionnel G_1 et,

d'autre part, entre E_2 et le groupement fonctionnel G_2 , sont, soit des groupes dénués de tout groupement fonctionnel comme des groupes hydrocarbonés saturés du type éthylène $(-\text{CH}_2)_2-$, propylène $(-\text{CH}_2)_3-$, butylène 5 $(-\text{CH}_2)_4-$ ou analogues, soit des groupes comportant un ou plusieurs groupements fonctionnels inaptes à réagir aux conditions opératoires dans lesquelles est réalisée la réaction de couplage, soit encore des groupes comportant un ou plusieurs groupements fonctionnels que 10 l'on protège, préalablement à la réalisation de la réaction de couplage, par un groupement protecteur approprié.

Conformément à l'invention, ledit au moins un dosage immunologique du composé Z est, de 15 préférence, un dosage en phase solide pour des raisons de simplicité de mise en œuvre.

Selon un premier mode de mise en œuvre préféré du procédé selon l'invention, E_2 correspondant, dans le composé $E_2-X_2-G_2$, au reste d'une molécule M_2 , 20 ledit au moins un dosage immunologique du composé Z est un dosage de type "sandwich" (ou à deux sites) et l'étape ii) comprend les étapes suivantes :

a₁) mettre le milieu réactionnel obtenu au temps t de réaction en contact avec une phase solide 25 sur laquelle est immobilisé l'anticorps AC_1 , pour obtenir la fixation du composé Z sur cette phase solide par liaison immunologique entre cet anticorps et le reste E_1 de ce composé ;

b₁) mettre la phase solide en contact avec 30 un conjugué comprenant l'anticorps AC_2 couplé à un marqueur, pour obtenir la fixation de ce conjugué sur

cette phase solide par liaison immunologique entre cet anticorps et le reste E_2 du composé Z fixé sur ladite phase solide ;

5 c₁) mesurer la quantité de conjugué fixé sur la phase solide à l'aide du marqueur couplé à l'anticorps AC_2 ; et

10 d₁) déterminer sur une gamme d'étalonnage la concentration en composé Z du milieu réactionnel audit temps t à partir de la quantité de conjugué ainsi mesurée ;

ladite étape ii) comprenant, de plus, une ou plusieurs opérations de lavage de la phase solide entre les étapes a₁) et b₁), et entre les étapes b₁) et c₁).

15 Ce dosage utilise donc les deux anticorps AC_1 et AC_2 , l'anticorps AC_1 étant immobilisé sur la phase solide et l'anticorps AC_2 étant couplé à un marqueur.

20 Selon un autre mode de mise en œuvre préféré du procédé selon l'invention, E_2 correspondant, dans le composé $E_2-X_2-G_2$, à un groupe apte à former au moins une liaison covalente avec l'anticorps AC_1 , ledit au moins un dosage immunologique du composé Z est un dosage de type "SPIE-IA" (Solid-Phase Epitope ImmunoAssay) tel que décrit dans US-A-5,476,770 [7], et 25 l'étape ii) comprend les étapes suivantes :

30 a₂) mettre le milieu réactionnel obtenu au temps t de réaction en contact avec une phase solide sur laquelle est immobilisé l'anticorps AC_1 , pour obtenir la fixation du composé Z sur cette phase solide par liaison immunologique entre cet anticorps et le reste E_1 de ce composé ;

5 b₂) faire réagir un agent de couplage avec l'anticorps AC₁ immobilisé sur la phase solide et le groupe E₂ du composé Z fixé sur cette phase solide, pour obtenir la formation d'une ou plusieurs liaisons covalentes entre cet anticorps et ce groupe ;

10 c₂) dénaturer la liaison immunologique existant entre l'anticorps AC₁ immobilisé sur la phase solide et le reste E₁ du composé Z fixé sur cette phase solide, pour libérer ce reste de cette phase solide ;

15 d₂) mettre la phase solide en contact avec un conjugué comprenant l'anticorps AC₁ couplé à un marqueur, pour obtenir la fixation de ce conjugué par liaison immunologique entre l'édit anticorps et le reste E₁ du composé Z ainsi libéré ;

20 e₂) mesurer la quantité de conjugué fixé sur la phase solide à l'aide du marqueur couplé à l'anticorps AC₁ ; et

25 f₂) déterminer sur une gamme d'étalonnage la concentration en composé Z du milieu réactionnel audit temps t à partir de la quantité de conjugué ainsi mesurée ;

ladite étape ii) comprenant, de plus, une ou plusieurs opérations de lavage de la phase solide entre les étapes a₂) et b₂), b₂) et c₂), c₂) et d₂), et entre les 25 étapes d₂) et e₂).

30 Ce dosage n'utilise, lui, que l'anticorps AC₁ mais sous deux formes différentes : une première forme dans laquelle il est immobilisé sur la phase solide et une deuxième forme dans laquelle il est couplé à un marqueur.

L'agent de couplage que l'on utilise à l'étape b₂) peut être un réactif chimique, auquel cas il convient qu'il soit bifonctionnel, c'est-à-dire qu'il comprenne un premier groupe fonctionnel apte à réagir avec le groupe E₂ du composé E₂-X₂-G₂, et un deuxième groupe fonctionnel, identique ou différent du premier, apte à réagir avec l'anticorps AC₁.

Selon que ces groupes fonctionnels sont identiques ou différents, il peut s'agir d'un réactif homo-bifonctionnel comme le glutaraldéhyde, le difluoro-dinitrobenzene, le bis-(maléimido)hexane ou le disuccinimidyl subérate, ou d'un réactif hétéro-bifonctionnel comme le N-succinimidyl-3-3-(2-pyridyl-dithio)propionate ou le succinimidyl-4-(N-maléimido-méthyl)-cyclohexane-1-carboxylate.

De préférence, on utilise le glutaraldéhyde ou le disuccinimidyl subérate.

En variante, l'agent de couplage peut être une irradiation, par exemple ultra-violette, dans le cas où E₂ représente un groupe photo-activable.

A l'étape c₂), la dénaturation de la liaison immunologique existant entre l'anticorps AC₁ et le reste E₁ du composé Z peut être effectuée de façon classique au moyen d'un réactif approprié, ou encore sous l'action d'ultrasons ou de la chaleur.

Ce réactif peut être choisi parmi les acides comme HCl, les bases comme NaOH, les solvants organiques comme, par exemple, les alcools du type méthanol, les agents tensioactifs et les sels minéraux.

Quelle que soit la technique choisie pour doser le composé Z :

5 - l'anticorps AC₁ et, le cas échéant, l'anticorps AC₂ peuvent être des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, même si, d'une manière générale, on préfère utiliser des anticorps monoclonaux en raison de leur plus grande spécificité ;

10 - l'immobilisation de l'anticorps AC₁ sur la phase solide peut être une immobilisation passive ou active ; ainsi, cette immobilisation peut être obtenue par simple adsorption dudit anticorps à la surface de la phase solide, par liaison covalente, par l'intermédiaire de molécules de liaison comme le système avidine-biotine, ou encore par l'intermédiaire d'une étiquette polyhistidine associée au complexe nickel ou cuivre/NTA (acide nitrilo triacétique) ;
15 lorsque l'anticorps AC₁ est un anticorps monoclonal, son immobilisation sur la phase solide peut être également obtenue par l'intermédiaire d'un anticorps polyclonal préalablement adsorbé à la surface de cette phase solide ;

20 - la phase solide peut être l'une quelconque des phases solides classiquement employées pour les dosages immunologiques comme la paroi d'un tube ou d'un puits d'un plaque de microtitration, une membrane constituée d'un matériau plastique comme le polystyrène ou la nitrocellulose, des billes de verre, des billes magnétiques et, de manière générale, toute surface sur laquelle il est possible de fixer, de manière passive ou active, un anticorps ; et

25 - le marqueur peut être un isotope comme l'iode 125, le chrome 51 ou le tritium, une enzyme comme la peroxydase de raifort, la phosphatase

alcaline, l'acétylcholine estérase ou la glucose oxydase, un marqueur luminescent comme le pyrogallol, le luminol ou l'isoluminol, un marqueur fluorescent comme la fluoroscéine, l'isothiocyanate de fluorescéine, la rhodamine ou la cyanine, ou encore une substance capable de réagir avec l'avidine ou la streptavidine comme la biotine et ses analogues structuraux ; dans ce dernier cas, l'avidine ou la streptavidine est elle-même marquée, par exemple par une enzyme ou un fluorochrome.

De préférence, l'anticorps AC₁ et, le cas échéant, l'anticorps AC₂ sont des anticorps monoclonaux ; la phase solide est la paroi d'un puits d'une plaque de microtitration ; l'immobilisation de l'anticorps AC₁ est réalisée par adsorption passive de cet anticorps à la surface de cette phase et le marqueur est une enzyme, notamment l'acétylcholine estérase, en raison de son "turn-over" (16 000 molécules de substrat hydrolysées par seconde et par site) qui confère aux conjugués qui la renferment une forte activité spécifique.

Conformément à l'invention, le procédé comprend, avantageusement, une opération de dilution du milieu réactionnel entre les étapes i) et ii).

Par ailleurs, les effets de la ou des conditions opératoires candidates sur la réaction de couplage sont, de préférence, évalués à l'étape iii) en déterminant le rendement de cette réaction à partir de la concentration en composé Z du milieu réactionnel telle que déterminée à l'étape ii).

Ce rendement peut, par exemple, être calculé en appliquant la formule suivante :

$$Rdt (\%) = \left(\frac{[Z] \times f}{[E_1-X_1-G_1]} \right) \times 100$$

5 dans laquelle :

- [Z] est la concentration en composé Z du milieu réactionnel telle que déterminée à l'étape ii) et f est le facteur de dilution de ce milieu dans le cas où ce dernier a été soumis à une dilution entre l'étape i) et 10 l'étape ii), tandis que
 - $[E_1-X_1-G_1]$ est la concentration initiale en composé $E_1-X_1-G_1$ du milieu réactionnel.

15 Comme précédemment indiqué, la réaction de couplage, dont on souhaite cribler les conditions opératoires, peut consister à coupler deux ou plus de deux groupements fonctionnels, le nombre de groupements fonctionnels mis en jeu dans cette réaction étant, de préférence, égal à 2, 3 ou 4.

20 Lorsque la réaction de couplage consiste à coupler deux groupements fonctionnels G_1 et G_2 , alors :

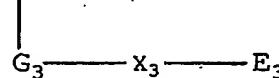
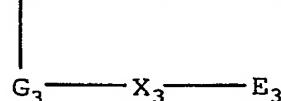
25 - à l'étape i), on fait réagir ensemble les composés de formules $E_1-X_1-G_1$ et $E_2-X_2-G_2$ pour obtenir la formation dans le milieu réactionnel d'un composé Z qui répond à la formule $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$ dans laquelle X_1 , X_2 , E_1 et E_2 ont la même signification que précédemment et G_1-G_2 représente le groupe d'atomes résultant du couplage entre lesdits groupements fonctionnels G_1 et G_2 ; tandis que

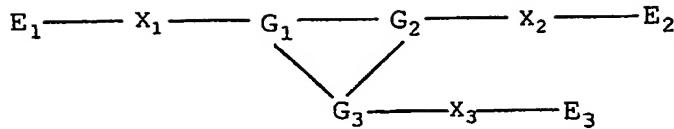
30 - à l'étape ii), la concentration en composé Z du milieu réactionnel est déterminée par un

seul dosage immunologique, lequel est, de préférence, un dosage en phase solide de type "sandwich" ou de type "SPIE-IA" tel que précédemment décrit.

Lorsque la réaction de couplage consiste à 5 coupler trois groupements fonctionnels G_1 , G_2 et G_3 , alors :

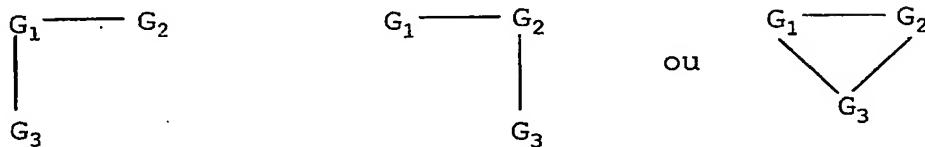
- à l'étape i), on fait réagir les composés de formules $E_1-X_1-G_1$ et $E_2-X_2-G_2$ avec un troisième composé de formule $E_3-X_3-G_3$ dans laquelle X_3 représente 10 une liaison covalente ou un troisième groupe espaceur, identique ou différent de X_1 et/ou de X_2 , tandis que E_3 représente, soit le reste d'une troisième molécule M_3 différente de M_1 et de M_2 et pour laquelle on dispose 15 d'un troisième anticorps AC_3 spécifique, soit un groupe apte à former une liaison covalente avec l'anticorps AC_1 en présence d'un agent de couplage à condition toutefois que E_2 ne représente pas déjà un tel groupe, pour obtenir la formation dans le milieu réactionnel 20 d'un composé Z répondant à l'une des formules ci-après :





dans lesquelles X_1 , X_2 , X_3 , E_1 , E_2 et E_3 ont la même signification que précédemment et

5



représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits groupements fonctionnels G_1 , G_2 et G_3 ; tandis que

10 - à l'étape ii), la concentration en composé Z du milieu réactionnel est déterminée par deux dosages immunologiques différents.

15 Ces dosages, qui peuvent être conduits en parallèle, c'est-à-dire sur deux échantillons différents du milieu réactionnel, ou l'un à la suite de l'autre sur le même échantillon du milieu réactionnel, sont préférentiellement tous deux effectués en phase solide.

20 Ainsi, il peut s'agir de deux dosages de type "sandwich" que l'on réalise en utilisant :

- pour le premier dosage, l'anticorps AC_1 immobilisé sur la phase solide et l'anticorps AC_2 couplé à un premier marqueur, et

25 - pour le deuxième dosage, l'anticorps AC_1 immobilisé sur la phase solide et l'anticorps AC_3 couplé à un deuxième marqueur,

les premier et deuxième marqueurs pouvant être identiques dans le cas où les deux dosages sont conduits en parallèle, mais devant être différents dans le cas où ils sont conduits l'un à la suite de l'autre.

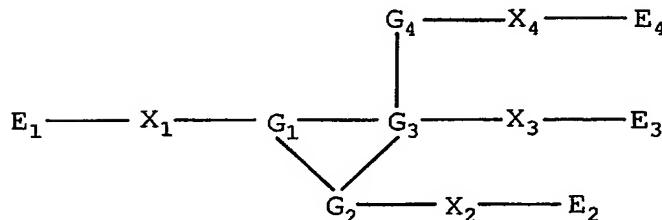
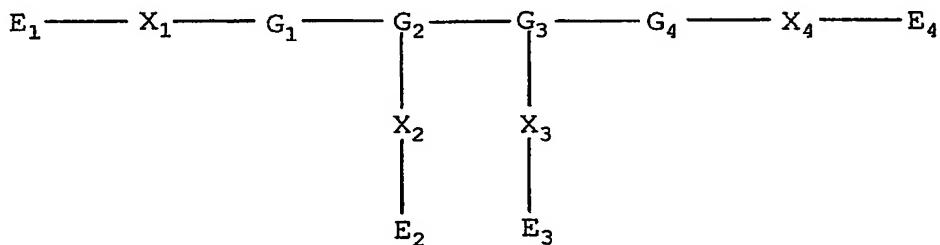
5 En variante, le premier dosage peut être un dosage de type "SPIE-IA" que l'on réalise en utilisant l'anticorps AC_1 comme précédemment décrit, auquel cas le deuxième dosage est un dosage de type "sandwich" que l'on réalise en utilisant l'anticorps AC_2 ou 10 l'anticorps AC_3 couplé à un marqueur selon que, dans les composés $E_2-X_2-G_2$ et $E_3-X_3-G_3$, c'est E_2 ou E_3 qui représente le groupe apte à former une ou plusieurs liaisons covalentes avec l'anticorps AC_1 au cours du dosage "SPIE-IA".

15 Dans tous les cas, la formation du composé
z dans le milieu réactionnel est garantie par la
concordance des concentrations en ce composé telles que
déterminées par les deux dosages.

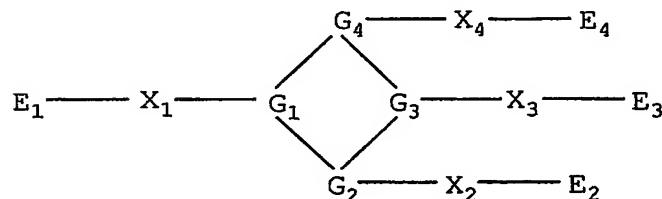
Lorsque la réaction de couplage consiste à
coupler quatre groupements fonctionnels G_1 , G_2 , G_3 et G_4 , alors :

25 - à l'étape i), on fait réagir les composés de formule $E_1-X_1-G_1$ et $E_2-X_2-G_2$ avec un troisième composé de formule $E_3-X_3-G_3$ telle que précédemment définie et un quatrième composé de formule $E_4-X_4-G_4$ dans laquelle X_4 représente une liaison covalente ou un quatrième groupe espaceur, identique ou différent de X_1 , X_2 et/ou X_3 , tandis que E_4 représente soit le reste d'une troisième molécule M_4 différente de M_1 , de M_2 et de M_3 et pour 30 laquelle on dispose d'un quatrième anticorps AC_4 spécifique, soit un groupe apte à former une liaison

covalente avec l'anticorps AC_1 en présence d'un agent de couplage à la condition toutefois que E_2 et E_3 ne représentent pas déjà un tel groupe, pour obtenir la formation dans le milieu réactionnel d'un composé Z répondant à l'une des formules ci-après :

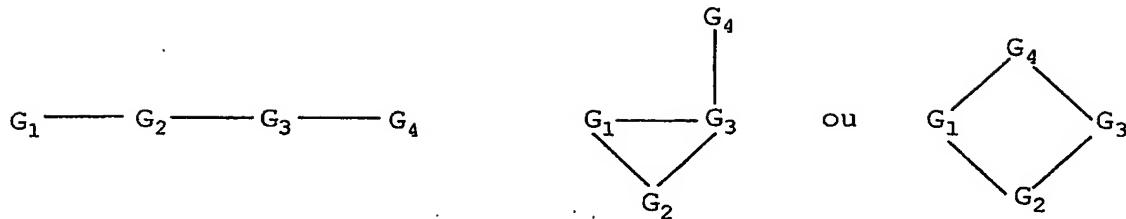


10



dans lesquelles X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , E_1 , E_2 , E_3 et E_4 ont la même signification que précédemment et

15



représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits groupements fonctionnels G_1 , G_2 , G_3 et G_4 ;
 5 tandis que

- à l'étape ii), la concentration en composé Z du milieu réactionnel est déterminée par trois dosages immunologiques différents.

10 Là également, ces dosages peuvent être conduits en parallèle ou les uns à la suite des autres et sont préférentiellement tous trois effectués en phase solide. Il peut s'agir de trois dosages de type "sandwich" ou d'un dosage de type "SPIE-IA" suivi de deux dosages de type "sandwich", la formation du 15 composé Z dans le milieu réactionnel étant, là encore, garantie par la concordance des résultats obtenus.

Conformément à l'invention, les conditions opératoires candidates sont, de préférence, choisies dans le groupe constitué par les solvants, les 20 catalyseurs, les niveaux de température, les niveaux de pression, l'utilisation d'ultrasons, les concentrations (des substances mises à réagir et/ou du catalyseur), les rapports stœchiométriques (entre ces substances), les durées de réaction et leurs combinaisons.

25 Ainsi, le procédé selon l'invention peut aussi bien être utilisé pour cribler des conditions opératoires d'un seul type comme, par exemple, des catalyseurs ou des niveaux de température ou des

niveaux de pression, que pour cribler des combinaisons de conditions opératoires de types différents comme des combinaisons solvant/catalyseur, solvant/catalyseur/durée de la réaction, température/pression, catalyseur/5 température/pression, ou analogues.

Dans ce qui précède et ce qui suit, on entend par "catalyseur", tout agent qui, par sa seule présence au sein du milieu réactionnel, est apte à accélérer la cinétique d'une réaction.

10 Ce catalyseur peut être aussi bien un catalyseur chimique comme, par exemple, un composé organique, une base inorganique, un métal, un sel métallique, un oxyde ou hydrure métallique, un composé organométallique, un complexe métal-ligand, un 15 halogénure, ou encore une combinaison de ceux-ci, ..., qu'un catalyseur biologique, ce dernier pouvant se présenter sous des formes très diverses, et notamment sous la forme d'un organe, d'un tissu, d'une cellule, d'une fraction cellulaire, d'un organite cellulaire, 20 d'un extrait enzymatique, d'un complexe moléculaire ou encore d'une simple molécule, par exemple une enzyme isolée et purifiée.

Le procédé selon l'invention présente de nombreux avantages. En effet :

25 - il permet, dès lors que l'on dispose d'au moins une molécule apte à être greffée sur un groupement fonctionnel, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un groupe espaceur, et d'au moins un anticorps capable de reconnaître spécifiquement cette 30 molécule et de se lier avec elle, de doser le composé résultant du couplage de deux groupements fonctionnels

et ce, quels que soient ces derniers ; de ce fait, il suffit de disposer de quelques molécules greffables et de quelques anticorps spécifiques de ces molécules pour être en mesure de cribler les conditions opératoires de très nombreuses réactions de couplage par le procédé selon l'invention ;

- il permet de tester simultanément différents types de conditions opératoires, soit en parallèle, soit en combinaison, et ce, qu'il s'agisse de conditions qualitatives ou quantitatives ;

- il est compatible avec tous les systèmes catalytiques, qu'ils soient chimiques ou biologiques ;

- il ne nécessite aucune opération de purification des milieux réactionnels obtenus à l'issue de la réaction de couplage ;

- il permet d'apprécier les effets des conditions opératoires de manière quantitative, en donnant accès au rendement de la réaction de couplage ;

- il est très sensible, puisqu'il s'est révélé permettre la détection d'une concentration en composé Z jusqu'à 10^{-9} M, ce qui permet de le mettre en œuvre en utilisant des microvolumes de réactifs et de solvants ;

- il est reproductible ;

- il est simple à mettre en œuvre et ne requiert aucun équipement coûteux et/ou difficilement disponible ;

- il permet de réaliser des criblages à une cadence élevée ; ainsi, sa mise en œuvre sur un automate relativement simple, c'est-à-dire un automate assurant les lavages de la phase solide, une

distribution du substrat du marqueur enzymatique et la lecture de la réaction enzyme/substrat, mais n'assurant pas une distribution des autres réactifs, a permis à un seul expérimentateur de réaliser un millier de tests 5 par jour. Cette cadence est donc susceptible d'être multipliée par un facteur 10 (soit 10 000 tests/jour) par l'utilisation d'appareils permettant une automatisation complète du procédé selon l'invention.

Le procédé selon l'invention est donc 10 particulièrement bien adapté à la réalisation de criblages à "haut débit".

L'invention a aussi pour objet une trousse ou "kit" pour la mise en œuvre d'un procédé de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage 15 d'au moins deux groupements fonctionnels, qui comprend des quantités appropriées :

— d'au moins deux composés destinés à réagir ensemble :

• un premier composé de formule $E_1-X_1-G_1$ dans 20 laquelle G_1 représente un premier desdits au moins deux groupements fonctionnels, X_1 représente une liaison covalente ou un premier groupe espaceur et E_1 représente le reste d'une première molécule M_1 ; et

• un deuxième composé de formule $E_2-X_2-G_2$ dans 25 laquelle G_2 représente un deuxième desdits au moins deux groupements fonctionnels, X_2 représente une liaison covalente ou un deuxième groupe espaceur, identique ou différent de X_1 , et E_2 représente le reste d'une deuxième molécule M_2 différente de M_1 ;

30 — d'au moins deux anticorps :

• un premier anticorps AC_1 spécifique de la première molécule M_1 , cet anticorps étant éventuellement fixé sur une pluralité de phases solides ; et

5 • un deuxième anticorps AC_2 spécifique de la deuxième molécule M_2 , cet anticorps étant couplé à un marqueur ;

10 - d'un composé Z comprenant l'enchaînement $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$ dans lequel X_1 , X_2 , E_1 et E_2 ont la même signification que précédemment, tandis que G_1-G_2 représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits au moins deux groupements fonctionnels ; et éventuellement :

15 - d'un réactif de révélation du marqueur, par exemple un substrat si le marqueur est une enzyme ; et

- de tampons convenablement choisis (tampons de dilution, tampons de rinçage, ...).

20 L'invention a encore pour objet une trousse ou "kit" pour la mise en œuvre d'un procédé de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage d'au moins deux groupements fonctionnels, qui comprend des quantités appropriées :

25 - d'au moins deux composés destinés à réagir ensemble :

30 • un premier composé de formule $E_1-X_1-G_1$ dans laquelle G_1 représente un premier desdits au moins deux groupements fonctionnels, X_1 représente une liaison covalente ou un premier groupe espaceur et E_1 représente le reste d'une première molécule M_1 ; et

- un deuxième composé de formule $E_2-X_2-G_2$ dans laquelle G_2 représente un deuxième desdits au moins deux groupements fonctionnels, X_2 représente une liaison covalente ou un deuxième groupe espaceur, identique ou différent de X_1 , et E_2 représente un groupe apte à former une ou plusieurs liaisons covalentes avec un anticorps spécifique de la molécule M_1 en présence d'un agent de couplage ;
 - d'au moins un anticorps, cet anticorps étant ledit anticorps spécifique de la molécule M_1 ;
 - d'un conjugué comprenant ledit anticorps spécifique de la molécule M_1 couplé à un marqueur ;
 - d'un composé Z comprenant l'enchaînement $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$ dans lequel X_1 , X_2 , E_1 et E_2 ont la même signification que précédemment, tandis que G_1-G_2 représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits au moins deux groupements fonctionnels ; et éventuellement :
 - d'un réactif de révélation du marqueur,
 - d'un agent de couplage,
 - d'un réactif apte à dénaturer une liaison immunologique, et
 - de tampons convenablement choisis.

L'invention a, en outre, pour objet l'utilisation d'un procédé de criblage ou d'une trousse tel que précédemment défini pour le criblage, en particulier à "haut débit", de catalyseurs utiles dans une réaction de couplage entre deux groupements fonctionnels.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui

ressortiront du complément de description qui suit, qui se rapporte à des exemples de modes de mise en œuvre du procédé selon l'invention ayant permis de valider à la fois sa faisabilité et son intérêt pour le criblage à 5 "haut débit" de conditions opératoires.

Ce complément de description est donné à titre illustratif, et en aucun cas limitatif, et se réfère aux dessins annexés.

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

10 La figure 1 représente, sous une forme schématique, les différentes étapes d'un premier mode de mise en œuvre du procédé de criblage selon l'invention.

15 La figure 2 montre les résultats, en termes de rendements réactionnels, exprimés en %, d'un criblage de conditions opératoires réalisé conformément au premier mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention illustré sur la figure 1.

20 La figure 3 représente, sous une forme schématique, les différentes étapes d'un second mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention.

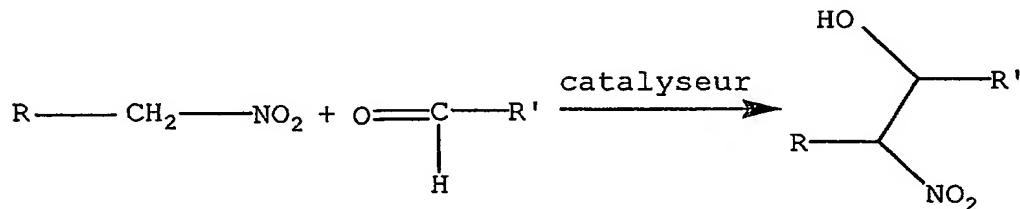
25 La figure 4 montre les résultats, en termes de rendements réactionnels, exprimés en %, d'un criblage de conditions opératoires réalisé conformément au second mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention illustré sur la figure 3.

EXEMPLES DE MODES DE MISE EN ŒUVRE DU PROCÉDÉ SELON
L'INVENTION

EXEMPLE 1 :

Le présent exemple illustre un premier mode
5 de mise en œuvre du procédé selon l'invention dans
lequel :

— la réaction de couplage est la réaction
de nitro-aldoïsation qui s'écrit :



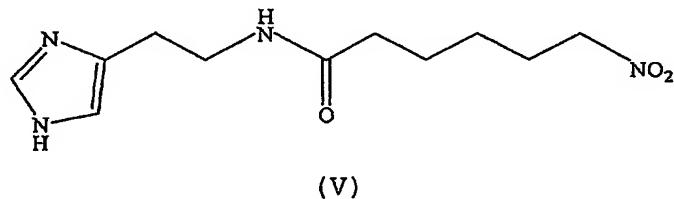
10

— le criblage porte sur trois types de
conditions opératoires prises en combinaison, à savoir
le type de solvant, le type de catalyseur et le temps
de réaction ; et

15 — la concentration en composé Z des milieux
réactionnels est déterminée par un dosage ELISA en
phase solide de type "sandwich".

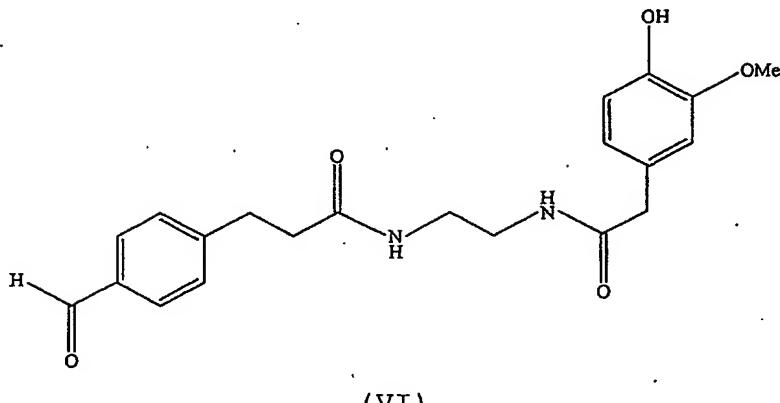
Le composé E₁-X₁-G₁ répond à la formule (V)
ci-après :

20



et résulte du couplage de l'acide 6-nitrocaproïque avec
25 l'histamine.

Le composé $E_2-X_2-G_2$ répond, lui, à la formule (VI) ci-après :



5

et résulte du couplage du N -(2-amino-éthyl)-3-(4-formylphényl)propionamide avec l'acide homovanillique.

La réaction de couplage des composés $E_1-X_1-G_1$ et $E_2-X_2-G_2$ est réalisée en utilisant :

10 - deux solvants candidats : le tétrahydrofuranne (THF) et le chlorure de méthylène (CH_2Cl_2) ;

15 - douze catalyseurs candidats : le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF), le fluorure de potassium (KF), la triéthylamine (TEA), la pyridine (PYR), la diisopropylamine (DIA), le diazabicyclo octane (DABCO), la diisopropyléthylamine (DIEA), le diazabicyclo undecène (DBU), la diméthylaminopyridine (DMAP), le méthoxyde de sodium ($NaOMe$), la soude ($NaOH$) et le carbonate de potassium (K_2CO_3), et

20 - quatre temps de réaction candidats : 30 minutes, 1 heure, 4 heures et 12 heures.

Le dosage immuno-enzymatique du composé Z (de formule $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$) produit par la réaction de couplage est réalisé en utilisant :

5 - un anticorps monoclonal dirigé contre l'histamine (anticorps His-31 ; $K_d : 10^{-9} \text{ M}$), qui a été immobilisé sur les parois des puits de plaques de microtitration en polystyrène (de capacité égale à 300 $\mu\text{l}/\text{puits}$) par "coating", c'est-à-dire par adsorption passive de cet anticorps à la surface de polystyrène ;

10 10 - un conjugué comprenant un anticorps monoclonal dirigé contre l'acide homovanillique (anticorps H6-92 ; $K_d : 10^{-7} \text{ M}$), couplé à l'acétylcholine estérase (AChE), ce conjugué étant préparé et stocké comme décrit par Taran et al. dans *Clin. Chem.*, 1997, 43(2), 363-368 [8] ; et

15 15 - le réactif de révélation, qui comprend un mélange d'iodure d'acétylthiocholine $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ et d'acide 5,5'-dithiobis-(2-nitro)benzoïque (réactif d'Ellman) $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4), pour mesurer la quantité de conjugué anticorps H6-92/AChE fixé sur la phase solide.

20 20 L'adsorption de l'anticorps His-31 à la surface des parois des puits des plaques de microtitration a été obtenue en déposant 100 μl d'une solution de cet anticorps à 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ dans du tampon phosphate 0,05 M, (pH 7,4) dans chacun de ces puits et en laissant les plaques pendant 18 heures à température ambiante. A la suite de quoi, les puits ont été lavés et saturés par 300 μl de tampon EIA, et les plaques ont été recouvertes de scotch et stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Le procédé, dont les différentes étapes sont schématisées sur la figure 1, est mis en œuvre selon le mode opératoire suivant.

5 1) Mode opératoire :

* Réaction de couplage (étape A de la figure 1) :

Après avoir protégé la fonction amine secondaire portée par le cycle azoté du reste de l'histamine présent dans le composé $E_1-X_1-G_1$ (reste E_1) par un groupe BOC (GP₁ sur la figure 1), et la fonction hydroxyle portée par le cycle du reste de l'acide homovanillique présent dans le composé $E_2-X_2-G_2$ (reste E_2), par un groupe diméthyl *tert*-butylsilyle (GP₂ sur la figure 2), on dépose successivement, dans chacun des puits de plaques de microtitration en polypropylène (capacité : 300 μ l/ puits) :

— 50 μ l d'une solution organique 5 mM du composé E_1-X-G_1 ,

— 50 μ l d'une solution organique 5 mM du composé G_2-Y-E_2 , et

— 25 μ l d'une solution organique 1 mM d'un catalyseur candidat, un seul et même solvant (THF ou CH_2Cl_2) étant utilisé dans chaque puits.

Les plaques de microtitration sont placées dans un agitateur incubateur, à une température de 40°C, et y sont maintenues le temps de réaction désiré.

* Arrêt de la réaction de couplage et déprotection (étape B de la figure 1) :

La réaction de couplage est stoppée et les groupements protecteurs sont enlevés par addition de 5 125 µl d'acide trifluoroacétique (TFA) pur dans les puits. Les plaques sont agitées pendant 15 minutes à température ambiante.

* Dilution des milieux réactionnels (étape C 10 de la figure 1) :

Chaque milieu réactionnel est dilué en prélevant 10 µl de ce milieu et en l'ajoutant à 1 ml de tampon EIA (tampon phosphate 0,1 M ; NaCl 0,15 M; BSA 0,1% ; azoture de sodium 0,01% ; pH 7,4) contenu dans 15 un puits de plaques deep-well (capacité : 2 ml/puits).

Cette opération est répétée deux fois en sorte que chaque milieu réactionnel est dilué 10^6 fois.

* Dosage du composé Z :

20 50 µl de chaque milieu réactionnel dilué sont déposés dans un puits d'une plaque de microtitration dont la paroi des puits est revêtue de l'anticorps His-31 (étape D de la figure 1).

25 La plaque est agitée pendant 1 heure à température ambiante, puis lavée 5 fois par un tampon de lavage consistant en un tampon phosphate 0,01 M, pH 7,4, contenant 0,05% de Tween[®] 20 (étape E de la figure 1).

30 Puis, on dépose, dans chaque puits, 50 µl d'une solution du conjugué H6-92/AChE à 5 unités Ellman/ml (UE), une unité Ellman étant définie comme la

quantité d'enzyme apte à produire une augmentation d'absorbance d'une unité pendant une minute dans un ml de réactif Ellman, pour un chemin optique d'un cm à 25°C (étape F de la figure 1).

5 La plaque est agitée pendant 3 heures à température ambiante, puis lavée 5 fois par le tampon de lavage (étape G de la figure 1).

10 200 µl de réactif de révélation (RV) sont alors introduits dans chaque puits. La plaque est agitée pendant 1 heure à température ambiante au terme de laquelle on mesure la densité optique (DO) à 414 nm du milieu contenu dans chaque puits au moyen d'un lecteur automatique.

15 A partir des valeurs de DO ainsi obtenues, on détermine, pour chaque milieu réactionnel, sa concentration en composé Z, par référence à une gamme étalon (qui permet de relier une valeur d'absorbance à une concentration en composé Z), puis le rendement de la réaction de nitro-aldolisation au moyen de la 20 formule de calcul du rendement précédemment mentionnée.

2) Résultats :

25 Les résultats sont présentés sur la figure 2, sous la forme d'une matrice dans laquelle les rendements réactionnels (exprimés en %) sont symbolisés par des ronds blancs, gris clair, gris moyen ou gris foncé, selon qu'ils sont compris entre 0 et 10%, entre 10 et 30%, entre 30 et 50% ou entre 50 et 70%.

30 Ces ronds sont répartis sur 8 lignes correspondant chacune à un temps de réaction candidat, et sur 12 colonnes correspondant chacune à un

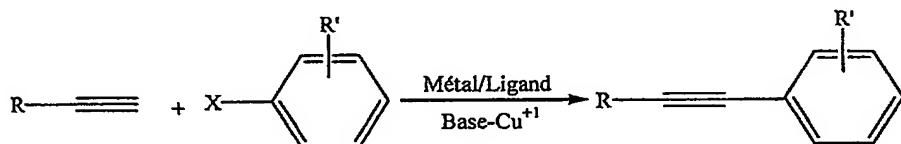
catalyseur candidat, les 4 lignes supérieures regroupant les rendements des réactions réalisées dans le THF, et les 4 lignes inférieures regroupant les rendements des réactions réalisées dans le CH_2Cl_2 :

5 La figure 2 montre, par exemple, que lorsque la réaction de nitro-aldolisation est effectuée pendant 4 heures dans du THF, seuls le diazabicyclo octane (DABCO) et la diméthylaminopyridine (DMAP) permettent d'obtenir un rendement réactionnel supérieur
10 10 à 50%, alors que, lorsqu'elle est réalisée pendant le même temps dans du CH_2Cl_2 , un tel rendement n'est obtenu qu'en présence de fluorure de tétra-butylammonium (TBAF).

15 **EXEMPLE 2 :**

Cet exemple illustre un deuxième mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention dans lequel :

20 - la réaction de couplage est la réaction de Sonogashira qui s'écrit :

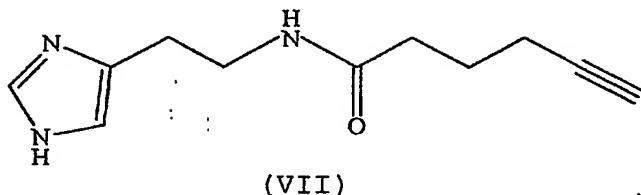


25 - le criblage porte sur deux types de conditions opératoires prises en combinaison, à savoir le type de solvant et le type de catalyseur ; et

- la concentration en composé Z des milieux réactionnels est déterminée par un dosage immuno-enzymatique en phase solide de type "SPIE-IA".

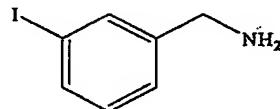
Dans cet exemple, le composé $E_1-X_1-G_1$ répond à la formule (VII) ci-après :

5



et résulte du couplage de l'acide 5-hexynoïque avec l'histamine.

10 Le composé $E_2-X_2-G_2$ répond, lui, à la formule (VIII) ci-après :



(VIII)

15 La réaction de couplage des composés $E_1-X_1-G_1$ et $E_2-X_2-G_2$ est réalisée en utilisant :

– trois solvants candidats : le diméthylformamide (DMF), le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le THF ;

20 20 La réaction de couplage des composés $E_1-X_1-G_1$ et $E_2-X_2-G_2$ est réalisée en utilisant :

– une banque de catalyseurs préparée *in situ* et dans laquelle chaque catalyseur correspond à une combinaison entre :

(1) un complexe métallique M choisi parmi les complexes M₁ à M₇ suivants :

M₁ : Pd₂dba₃

25 M₂ : Pd(PPh₃)₄

M₃ : Pd(OAc)₂

M₄ : PdCl₂(PPh₃)₂

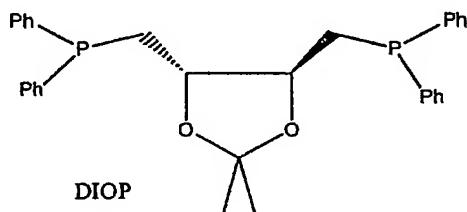
M₅ : PdCl₂(C₆H₅CN)₂

M6 : $\text{Pd}(\text{NH}_3)_4(\text{NO}_3)_2$

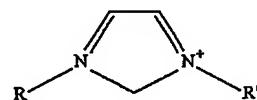
M7 : $\text{Ni}(\text{acac})_3$, et

(2) un ligand L choisi parmi les 23 ligands suivants :

- 5 • les ligands L1 à L12 répondant à la formule PR_3 dans laquelle R est respectivement un groupe *n*-butyle, *n*-octyle, *t*-butyle, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, phényle, *o*-tolyle, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, *o*,*p*-di- $\text{OCH}_3\text{C}_6\text{H}_3$ et *o*-furyle ;
- 10 • les ligands L13 à L17 répondant à la formule $\text{R}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{PR}_2$ dans laquelle R est un groupe méthyle et n est égal à 1 ou 2 (L13, L14), R est un groupe phényle et n est égal à 1, 2 ou 4 (L15, L16, L17) ;
- 15 • le ligand L18 ou ligand DIOP de formule :



- 20 • les complexes d'arsenic L19 et L20 de formule AsPh_3 et $(\text{Ph}_2)\text{As}(\text{CH}_2)_2\text{As}(\text{Ph}_2)$;
- 25 • les imidazoliums L21 à L23 répondant à la formule :



25 dans laquelle R est un groupe éthyle et R' est un groupe méthyle (L21) ; R et R' sont des

groupes t-butyle (L22) ; R et R' sont des groupes 2,6-diisopropylbenzene ;

(3) en présence d'une base choisie parmi la diisopropyléthylamine (DIEA) et le tert-butoxyde de 5 potassium (tBuOK), et de sels de cuivre choisis parmi l'iodure de cuivre (CuI) et le triflate de cuivre (CuOTf).

Le dosage immuno-enzymatique du composé Z (de formule E₁-X₁-G₁-G₂-X₂-E₂) produit par la réaction de 10 couplage est réalisé en utilisant :

- un anticorps monoclonal dirigé contre l'histamine (anticorps His-76 ; Kd : 10⁻⁸ M), qui a été immobilisé sur la paroi des puits de plaques de microtitration en polystyrène (capacité : 300 µl/puits) 15 par "coating", selon une technique analogue à celle décrite dans l'exemple 1 ;

- un conjugué comprenant cet anticorps couplé à l'AChE ; et
- le réactif de révélation décrit dans 20 l'exemple 1 pour mesurer la quantité de conjugué His-76/AChE fixé sur la phase solide.

Le procédé, dont les différentes étapes sont schématisées sur la figure 3, est mis en œuvre selon le mode opératoire suivant.

25.

1) Mode opératoire :

* Réaction de couplage (étape A de la figure

3) :

Après avoir protégé la fonction amine 30 portée par le cycle azoté du reste de l'histamine présent dans le composé E₁-X₁-G₁ (reste E₁) A et la

fonction amine du composé $E_2-X_2-G_2$ par des groupes BOC (GP sur la figure 3), on dépose successivement, dans chacun des trous de plaques de microtitration en polypropylène (capacité égale : 300 μ l/trou) et sous 5 atmosphère inerte :

- 5 μ l d'un solvant ou d'une solution organique 16 mM d'un complexe métallique M,
- 5 μ l d'un solvant ou d'une solution organique 32 mM d'un ligand L,
- 10 - 25 μ l d'une solution organique comprenant le composé $E_2-X_2-G_2$ à 160 mM, un sel de cuivre à 6,4 mM, une base à 480 mM, et
- 5 μ l d'une solution organique 800 mM du composé $E_1-X_1-G_1$,
- 15 un seul et même solvant (DMF, DMSO ou THF) étant utilisé pour chaque trou.

Les plaques sont placées dans un agitateur incubateur, à une température de 25°C, et y sont maintenues 24 heures.

20 * **Arrêt de la réaction de couplage et déprotection (étape B de la figure 3) :**

La réaction de couplage est stoppée et les groupements BOC sont enlevés par addition de 40 μ l de TFA pur dans chaque trou. Les plaques sont agitées 25 pendant 1 heure à température ambiante.

* **Dilution des milieux réactionnels (étape C de la figure 3) :**

30 Chaque milieu réactionnel est dilué en prélevant 10 μ l de ce milieu et en l'ajoutant à 1 ml de

tampon EIA contenu dans un puits d'une plaque deep-well (capacité : 2 ml/puits).

Cette opération est répétée deux fois en sorte que chaque milieu réactionnel est dilué 10^6 fois.

5

* Dosage du composé Z :

100 μ l de chaque milieu réactionnel dilué sont déposés dans un puits d'une plaque de microtitration dont la paroi des puits a été 10 préalablement revêtue de l'anticorps His-76.

15 Les plaques sont agitées pendant 1 heure à température ambiante, puis lavées 5 fois par du tampon de lavage consistant en un tampon phosphate 0,01 M, pH 7,4, contenant 0,05% de Tween[®] 20 (étape D de la figure 15 3).

Puis, on ajoute, dans chaque puits, 100 μ l d'un tampon borate 0,1 M (pH 9) et 10 μ l d'une solution de subérate de disuccinimidyle (DSS) à 10 mg/ml dans du DMF.

20 Les plaques sont agitées pendant 15 minutes à température ambiante, puis lavées 5 fois par le tampon de lavage (étape E de la figure 3).

25 On dépose alors, dans chaque puits, 150 μ l de NaOH 1N que l'on laisse agir 5 minutes à température ambiante. A l'issue de quoi, les plaques sont lavées 5 fois par le tampon de lavage (étape F de la figure 3).

30 On introduit, dans chaque puits, 100 μ l d'une solution du conjugué His-76/AChE à une unité Ellman/ml et les plaques sont agitées pendant 1 heure à température ambiante, puis lavées 5 fois par le tampon de lavage (étape G de la figure 3).

Pour mesurer la quantité du conjugué s'étant fixé sur la phase solide, on procède comme dans l'exemple 1, la mesure de la densité optique (DO) à 414 nm étant réalisée après 30 minutes ou 1 heure de 5 réaction enzymatique.

A partir des valeurs de DO ainsi obtenues, on détermine, pour chaque milieu réactionnel, sa concentration en composé Z, par référence à une gamme étalon, puis le rendement de la réaction de Sonogashira 10 par la même formule que celle utilisée dans l'exemple 1 ci-avant.

2) Résultats :

A titre illustratif, une partie des 15 résultats est présentée sur la figure 4, sous la forme d'une matrice dans laquelle les rendements réactionnels (exprimés en %) sont symbolisés par des ronds allant du blanc au gris foncé, selon qu'ils sont compris entre 0 et 10%, entre 10 et 20%, entre 20 et 30%, entre 30 et 20 40% ou entre 40 et 50%.

Ces ronds sont répartis sur 8 lignes qui correspondent pour la première, à l'absence de complexe métallique M (ligne M0) et pour les 7 autres, à l'un des complexes métalliques M1 à M7, et sur 24 colonnes 25 qui correspondent pour la première, à l'absence de ligand L (colonne L0) et pour les 23 autres, aux ligands L1 à L23.

Les résultats présentés sur la figure 4 sont ceux obtenus en utilisant le DMF comme solvant, la 30 DIEA comme base, l'iodure de cuivre comme sel de cuivre, 2% de métal M et 4% de ligand L.

On peut remarquer à la lumière de ces résultats que deux ligands (L12 et L19) s'avèrent les plus efficaces lorsqu'ils sont combinés au palladium.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Lavastre et Morken, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38(21), 3163-3165

5 [2] Böhm et Herrmann, *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, 3679-3681

[3] Löber et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 4366-4367

[4] Shaugnessy et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 10 2123-2132

[5] Blackmond et al., *Organic Process Research & Development*, 1999, 3(4), 275-280

[6] Hinderling et Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38(15), 2253-2256

15 [7] US-A-5,476,770

[8] Taran et al., *Clin. Chem.*, 1997, 43(2), 363-368

REVENDICATIONS

1. Procédé de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage d'au moins deux 5 groupements fonctionnels, qui comprend les étapes suivantes :

i) faire réagir ensemble au moins deux composés :

• un premier composé de formule $E_1-X_1-G_1$ dans 10 laquelle G_1 représente un premier desdits au moins deux groupements fonctionnels, X_1 représente une liaison covalente ou un premier groupe espaceur, tandis que E_1 représente le reste d'une première molécule M_1 pour laquelle on dispose d'un premier anticorps AC_1 15 spécifique, et

• un deuxième composé de formule $E_2-X_2-G_2$ dans laquelle G_2 représente un deuxième desdits au moins deux groupements fonctionnels, X_2 représente une liaison covalente ou un deuxième groupe espaceur, 20 identique ou différent de X_1 , tandis que E_2 représente, soit le reste d'une deuxième molécule M_2 différente de M_1 et pour laquelle on dispose d'un deuxième anticorps AC_2 spécifique, soit un groupe apte à former au moins 25 une liaison covalente avec l'anticorps AC_1 en présence d'un agent de couplage ;

lesdits au moins deux composés étant mis à réagir en solution dans un solvant et dans des conditions opératoires prédéterminées dont l'une au moins est une condition opératoire candidate, pour obtenir un milieu 30 réactionnel et la formation dans ce milieu d'un composé Z comprenant l'enchaînement $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$ dans lequel

X_1 , X_2 , E_1 et E_2 ont la même signification que précédemment, tandis que G_1-G_2 représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits au moins deux groupements fonctionnels ;

5 ii) déterminer la concentration en composé Z du milieu réactionnel à un temps t de réaction prédéterminé, par au moins un dosage immunologique utilisant au moins l'anticorps AC_1 ; et

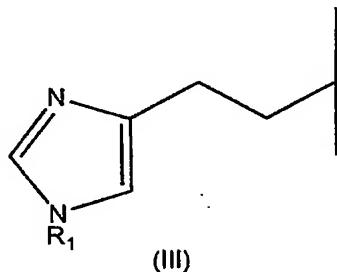
10 iii) évaluer les effets de la ou des conditions opératoires candidates sur ladite réaction de couplage à l'aide de la concentration en composé Z ainsi déterminée.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la réaction de couplage est choisie dans le groupe constitué par les réactions d'estérification, les réactions d'amidification, les réactions d'aldolisation et de nitro-aldolisation, la réaction de Heck, la réaction de Baylis-Hillman, la réaction de Michael, les réactions de métathèse, la réaction de Diels-Alder, la réaction de Sonogashira, la réaction de Suzuki, la réaction de Kumada, la réaction de Stille, la réaction de Hiyama, la réaction de Liebeskind-Srogl, la réaction de Mannich, la réaction de Hantzsch, la réaction de Bossio et al., la réaction de Ugi et leurs variantes.

3. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans lequel E_1 ou E_2 représente le reste de l'histamine.

4. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans lequel E_1 ou E_2 représente le reste de l'acide homovanillique.

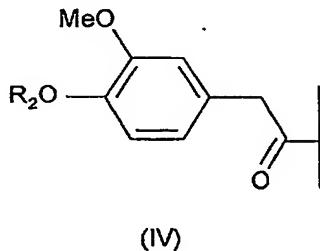
5 5. Procédé selon la revendication 3, dans lequel E_1 ou E_2 répond à la formule (III) ci-après :



10 dans laquelle R_1 représente un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur.

6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel E_1 ou E_2 répond à la formule (IV) ci-après :

15



dans laquelle R_2 représente un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur.

20

7. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans lequel E_2 représente un groupe

choisi parmi les groupes amine, acide carboxylique, aldéhyde, thiol, phénol, alkényle, azoture et les groupes photo-activables.

5 8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel E_2 représente un groupe amine ou thiol.

10 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel ledit au moins un dosage immunologique du composé Z est un dosage en phase solide.

15 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel, E_2 correspondant au reste d'une molécule M_2 , l'étape ii) comprend les étapes suivantes :

20 a₁) mettre le milieu réactionnel obtenu au temps t de réaction en contact avec une phase solide sur laquelle est immobilisé le premier anticorps AC_1 , pour obtenir la fixation du composé Z sur cette phase solide par liaison immunologique entre cet anticorps et le reste E_1 de ce composé ;

25 b₁) mettre la phase solide en contact avec un conjugué comprenant le deuxième anticorps AC_2 couplé à un marqueur, pour obtenir la fixation de ce conjugué sur cette phase solide par liaison immunologique entre le deuxième anticorps AC_2 et le reste E_2 du composé Z fixé sur ladite phase solide ;

30 c₁) mesurer la quantité de conjugué fixé sur la phase solide à l'aide du marqueur couplé à l'anticorps AC_2 ; et

d₁) déterminer sur une gamme d'étalonnage la concentration en composé Z du milieu réactionnel audit temps t à partir de la quantité de conjugué ainsi mesurée ;

5 ladite étape ii) comprenant, de plus, une ou plusieurs opérations de lavage de la phase solide entre les étapes a₁) et b₁), et entre les étapes b₁) et c₁).

11. Procédé selon l'une quelconque des 10 revendications 1, 2, 7 ou 8, dans lequel, E₂ correspondant à un groupe apte à former au moins une liaison covalente avec le premier anticorps AC₁, l'étape ii) comprend les étapes suivantes :

15 a₂) mettre le milieu réactionnel obtenu au temps t de réaction en contact avec une phase solide sur laquelle est immobilisé le premier anticorps AC₁, pour obtenir la fixation du composé Z sur cette phase solide par liaison immunologique entre cet anticorps et le reste E₁ de ce composé ;

20 b₂) faire réagir un agent de couplage avec le premier anticorps AC₁ immobilisé sur la phase solide et le groupe E₂ du composé Z fixé sur cette phase solide, pour obtenir la formation d'une ou plusieurs liaisons covalentes entre cet anticorps et ce groupe ;

25 c₂) dénaturer la liaison immunologique existant entre le premier anticorps AC₁ immobilisé sur la phase solide et le reste E₂ du composé Z fixé sur cette phase solide, pour libérer ce reste de cette phase solide ;

30 d₂) mettre la phase solide en contact avec un conjugué comprenant le premier anticorps AC₁ couplé

à un marqueur, pour obtenir la fixation de ce conjugué sur cette phase solide par liaison immunologique entre ledit anticorps et le reste E_1 du composé $E_1-X-G_1G_2-Y-E_2$ ainsi libéré ;

5 e₂) mesurer la quantité de conjugué fixé sur la phase solide à l'aide du marqueur couplé à l'anticorps AC_1 ; et

10 f₂) déterminer sur une gamme d'étalonnage la concentration en composé Z du milieu réactionnel audit temps t à partir de la quantité de conjugué ainsi mesurée ;

15 ladite étape ii) comprenant, de plus, une ou plusieurs opérations de lavage de la phase solide entre les étapes a₂) et b₂), b₂) et c₂), c₂ et d₂), et entre les étapes d₂) et e₂).

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le premier anticorps AC_1 est un anticorps monoclonal.

20

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 10, dans lequel le deuxième anticorps AC_2 est un anticorps monoclonal.

25

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la phase solide est la paroi d'un puits d'une plaque de microtitration sur laquelle est adsorbé le premier anticorps AC_1 .

15. Procédé selon la revendication 10 ou la revendication 11, dans lequel le marqueur est une enzyme, de préférence, l'acétylcholine estérase.

5 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend une opération de dilution du milieu réactionnel entre les étapes i) et ii).

10 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel on détermine le rendement de la réaction de couplage à partir de la concentration en composé Z du milieu réactionnel.

15 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la réaction de couplage consiste à coupler 2, 3 ou 4 groupements fonctionnels.

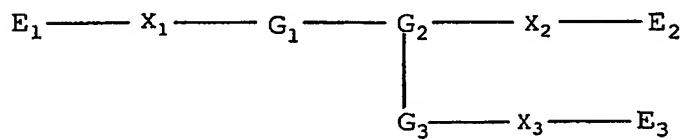
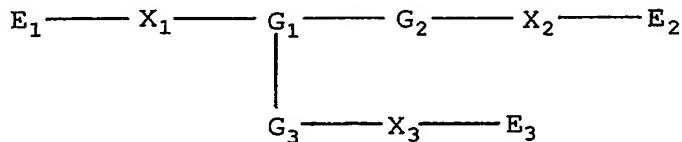
20 19. Procédé selon la revendication 18, dans lequel la réaction de couplage consiste à coupler deux groupements fonctionnels G_1 et G_2 , et dans lequel :

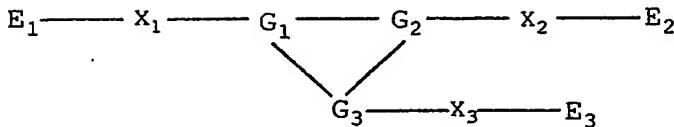
25 - à l'étape i), on fait réagir ensemble les composés de formules $E_1-X_1-G_1$ et $E_2-X_2-G_2$ pour obtenir la formation dans le milieu réactionnel d'un composé Z qui répond à la formule $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$ dans laquelle X_1 , X_2 , E_1 et E_2 ont la même signification que précédemment et G_1-G_2 représente le groupe d'atomes résultant du couplage entre lesdits groupements fonctionnels G_1 et G_2 ; tandis que

- à l'étape ii), la concentration en composé Z du milieu réactionnel est déterminée par un seul dosage immunologique.

5 20. Procédé selon la revendication 18, dans lequel la réaction de couplage consiste à coupler trois groupements fonctionnels G_1 , G_2 et G_3 , et dans lequel :

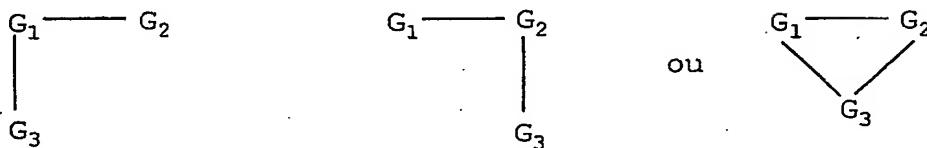
- à l'étape i), on fait réagir les composés de formules $E_1-X_1-G_1$ et $E_2-X_2-G_2$ avec un troisième 10 composé de formule $E_3-X_3-G_3$ dans laquelle X_3 représente une liaison covalente ou un troisième groupe espaceur, identique ou différent de X_1 et/ou de X_2 , tandis que E_3 représente, soit le reste d'une troisième molécule M_3 différente de M_1 et de M_2 et pour laquelle on dispose 15 d'un troisième anticorps AC_3 spécifique, soit un groupe apte à former une liaison covalente avec l'anticorps AC_1 en présence d'un agent de couplage à condition toutefois que E_2 ne représente pas déjà un tel groupe, pour obtenir la formation dans le milieu réactionnel 20 d'un composé Z répondant à l'une des formules ci-après :





dans lesquelles X_1 , X_2 , X_3 , E_1 , E_2 et E_3 ont la même signification que précédemment et

5



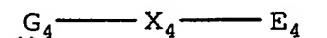
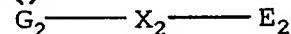
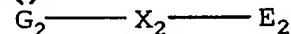
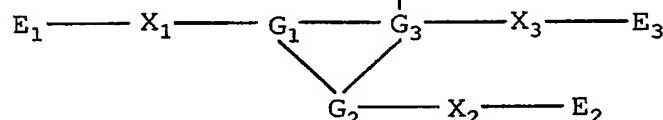
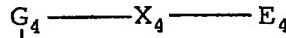
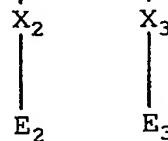
représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits groupements fonctionnels G_1 , G_2 et G_3 ; tandis que

10 à l'étape ii), la concentration en composé Z du milieu réactionnel est déterminée par deux dosages immunologiques différents.

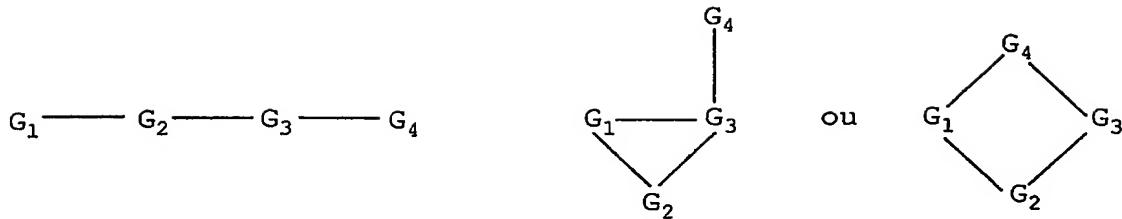
15 21. Procédé selon la revendication 18, dans lequel la réaction de couplage consiste à coupler quatre groupements fonctionnels G_1 , G_2 , G_3 et G_4 , et dans lequel :

20 - à l'étape i), on fait réagir les composés de formule $E_1-X_1-G_1$ et $E_2-X_2-G_2$ avec un troisième composé de formule $E_3-X_3-G_3$ telle que précédemment définie et un quatrième composé de formule $E_4-X_4-G_4$ dans laquelle X_4 représente une liaison covalente ou un quatrième groupe espaceur, identique ou différent de X_1 , X_2 et/ou X_3 , tandis que E_4 représente soit le reste d'une troisième molécule M_4 différente de M_1 , de M_2 et de M_3 et pour laquelle on dispose d'un quatrième anticorps AC_4

spécifique, soit un groupe apte à former une liaison covalente avec l'anticorps AC_1 en présence d'un agent de couplage à la condition toutefois que E_2 et E_3 ne représentent pas déjà un tel groupe, pour obtenir la 5 formation dans le milieu réactionnel d'un composé Z répondant à l'une des formules ci-après :



10 dans lesquelles X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , E_1 , E_2 , E_3 et E_4 ont la 15 même signification que précédemment et



5 représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits groupements fonctionnels G₁, G₂, G₃ et G₄ ; tandis que

10 - à l'étape ii), la concentration en composé Z du milieu réactionnel est déterminée par trois dosages immunologiques différents.

15 22. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la ou les conditions opératoires candidates sont choisies dans le groupe constitué par les solvants, les catalyseurs, les niveaux de température, les niveaux de pression, l'utilisation d'ultrasons, les concentrations, les rapports stœchiométriques, les durées de réaction et leurs combinaisons.

20 23. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la ou les conditions opératoires candidates sont des catalyseurs.

25 24. Trousse ou "kit" pour la mise en œuvre d'un procédé de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage d'au moins deux groupements fonctionnels, qui comprend des quantités appropriées :

- d'au moins deux composés destinés à réagir ensemble :

• un premier composé de formule $E_1-X_1-G_1$ dans laquelle G_1 représente un premier desdits au moins deux groupements fonctionnels, X_1 représente une liaison covalente ou un premier groupe espaceur et E_1 représente le reste d'une première molécule M_1 ; et

10 • un deuxième composé de formule $E_2-X_2-G_2$ dans laquelle G_2 représente un deuxième desdits au moins deux groupements fonctionnels, X_2 représente une liaison covalente ou un deuxième groupe espaceur, identique ou différent de X_1 , et E_2 représente le reste d'une deuxième molécule M_2 différente de M_1 ;

- d'au moins deux anticorps :

15 • un premier anticorps AC_1 spécifique de la première molécule M_1 , cet anticorps étant éventuellement fixé sur une pluralité de phases solides ; et

20 • un deuxième anticorps AC_2 spécifique de la deuxième molécule M_2 , cet anticorps étant couplé à un marqueur ;

25 - d'un composé Z comprenant l'enchaînement $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$ dans lequel X_1 , X_2 , E_1 et E_2 ont la même signification que précédemment, tandis que G_1-G_2 représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits au moins deux groupements fonctionnels ; et éventuellement :

30 - d'un réactif de révélation du marqueur, par exemple un substrat si le marqueur est une enzyme ; et

- de tampons convenablement choisis.

25. Trousse ou "kit" pour la mise en œuvre d'un procédé de criblage de conditions opératoires d'une réaction de couplage d'au moins deux groupements fonctionnels, qui comprend des quantités appropriées :

5 - d'au moins deux composés destinés à réagir ensemble :

10 • un premier composé de formule $E_1-X_1-G_1$ dans laquelle G_1 représente un premier desdits au moins deux groupements fonctionnels, X_1 représente une liaison covalente ou un premier groupe espaceur et E_1 représente le reste d'une première molécule M_1 ; et

15 • un deuxième composé de formule $E_2-X_2-G_2$ dans laquelle G_2 représente un deuxième desdits au moins deux groupements fonctionnels, X_2 représente une liaison covalente ou un deuxième groupe espaceur, identique ou différent de X_1 , et E_2 représente un groupe apte à former une ou plusieurs liaisons covalentes avec un anticorps spécifique de la molécule M_1 en présence 20 d'un agent de couplage ;

25 - d'au moins un anticorps, cet anticorps étant ledit anticorps spécifique de la molécule M_1 ;

30 - d'un conjugué comprenant ledit anticorps spécifique de la molécule M_1 couplé à un marqueur ;

25 - d'un composé Z comprenant l'enchaînement $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$ dans lequel X_1 , X_2 , E_1 et E_2 ont la même signification que précédemment, tandis que G_1-G_2 représente le groupe d'atomes résultant du couplage desdits au moins deux groupements fonctionnels ; et 30 éventuellement :

35 - d'un réactif de révélation du marqueur,

- d'un agent de couplage,
- d'un réactif apte à dénaturer une liaison immunologique, et
- de tampons convenablement choisis.

5

26. Utilisation d'un procédé de criblage selon l'une quelconque des revendications 1 à 23 ou d'une trousse ou "kit" selon la revendication 24 ou la revendication 25, pour le criblage, en particulier à 10 "haut débit", de catalyseurs utiles dans une réaction de couplage entre deux groupements fonctionnels.

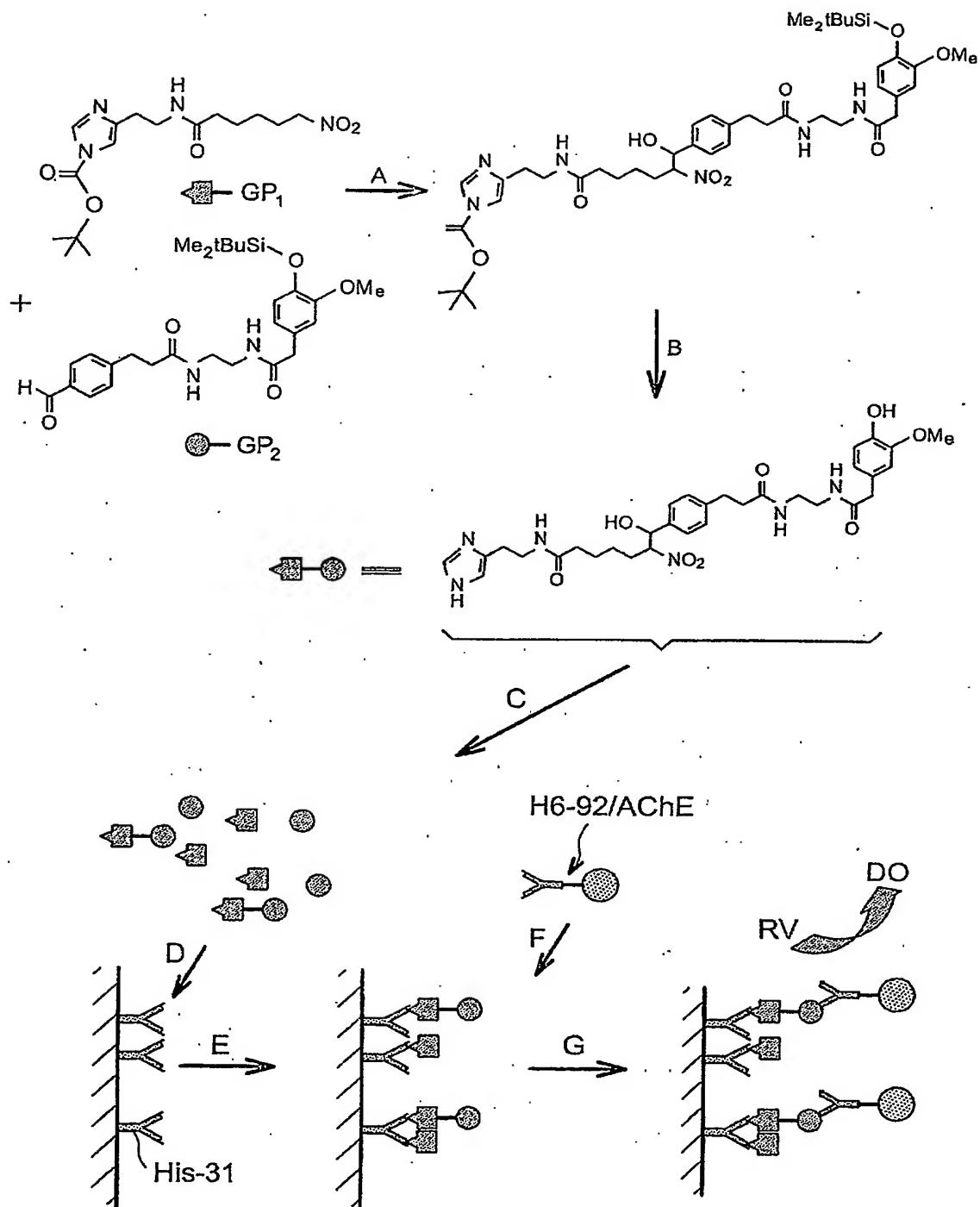
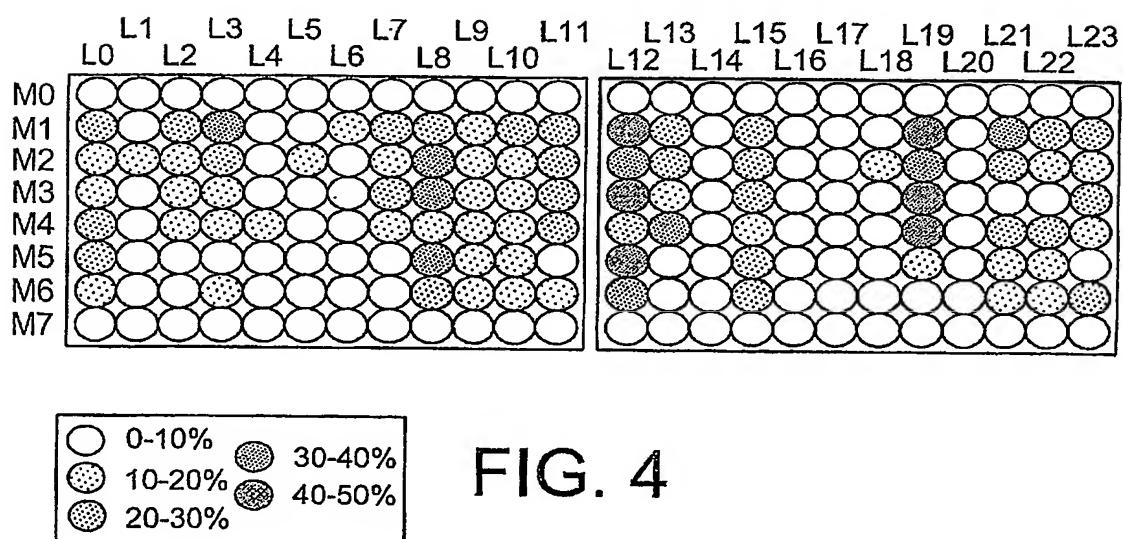
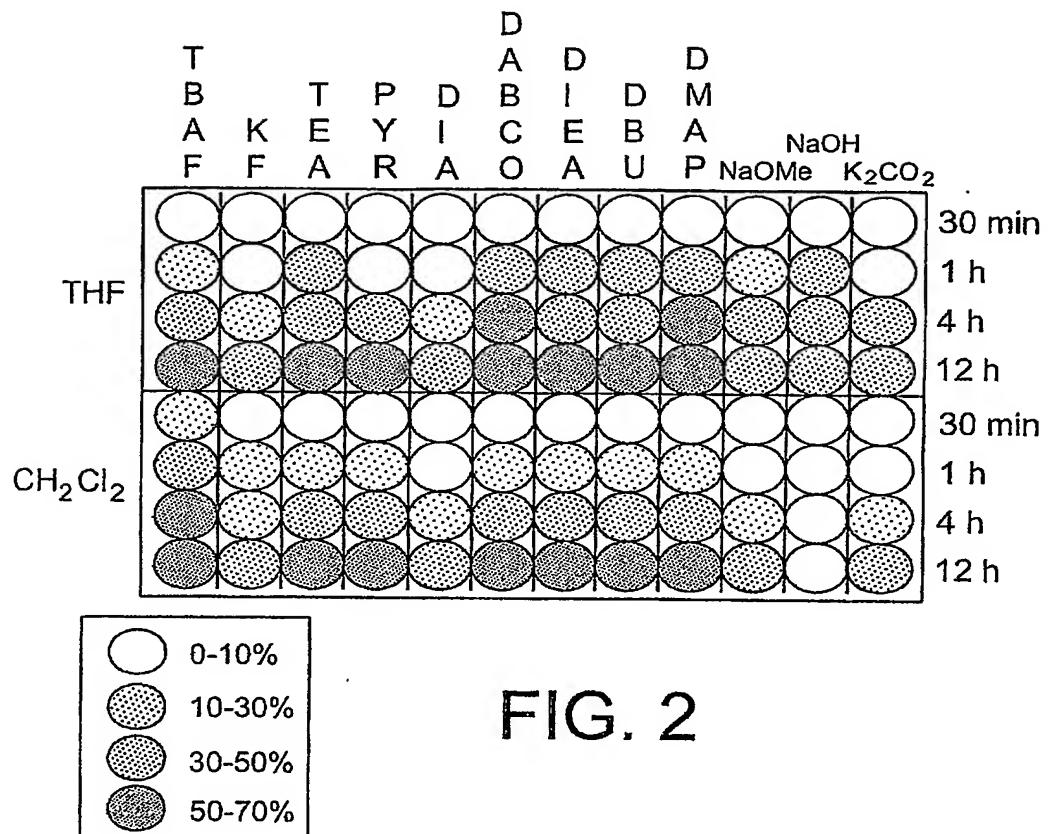


FIG. 1

B.14076

2 / 3



3 / 3

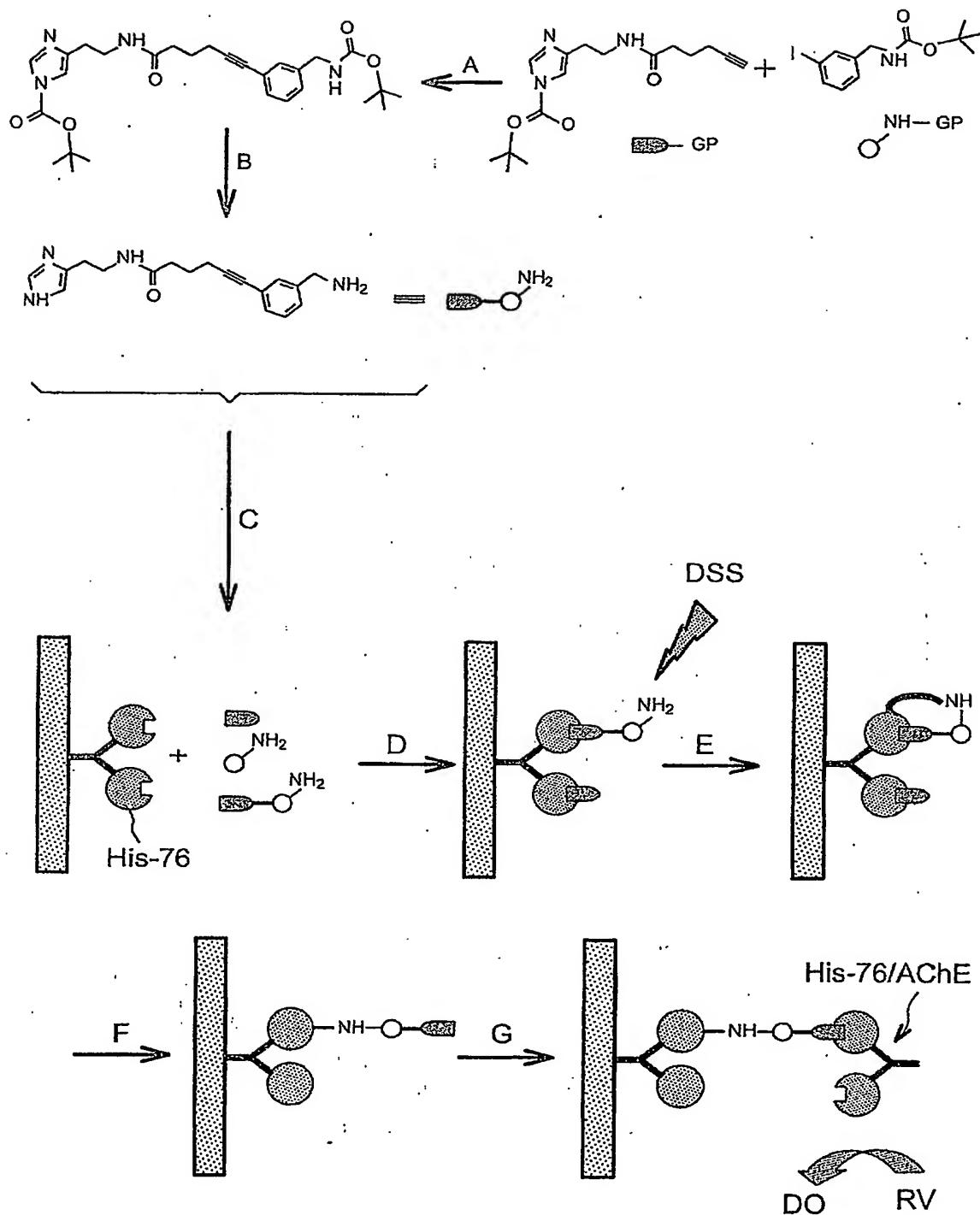


FIG. 3

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601



Vos références pour ce dossier (facultatif)		B14076.3/SLDEPOT ELECTRONIQUE
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		03.50106 DU 15.04.2003
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
PROCEDE DE CIBLAGE DE CONDITIONS OPERATOIRES D'UNE REACTION CHIMIQUE DE COUPLAGE ET TROUSSES POUR LA MISE EN OEUVRE DE CE PROCEDE.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31-33 rue de la Fédération 75752 PARIS 15 ème.		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		TARAN
Prénoms		Frédéric
Adresse	Rue	7 Allée du Pré Clair
	Code postal et ville	91190 GIF SUR YVETTE
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		CREMINON
Prénoms		Christophe
Adresse	Rue	30, avenue Saint Laurent Bâtiment C2
	Code postal et ville	91140 ORSAY
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		RENARD
Prénoms		Pierre-Yves
Adresse	Rue	30 rue de Rivoli
	Code postal et ville	75004 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
PARIS LE 24 JUIN 2003		